



Mariana Supico Santos Silva

Licenciada em Ciências de Engenharia Química e Bioquímica

Implementação e validação de um método de ensaio para análise de formaldeído em águas por SPME-GC/MS

Dissertação para obtenção do grau de mestre em Engenharia
Química e Bioquímica

Orientador: Doutor Vítor Vale Cardoso, EPAL, SA, Supervisor de Laboratório de Análises
de Água da EPAL

Coorientador: Professor Mário Eusébio, FCT/UNL, Professor auxiliar do DQ da FCT
NOVA

Júri:

Presidente: Professora Isabel Alexandra de Almeida Canento Esteves Esperança,
Professora auxiliar do DQ da FCT NOVA

Arguente: Professor Marco Diogo Richter Gomes da Silva, Professor Associado com
Agregação do DQ da FCT NOVA

Vogal: Doutor Vítor Vale Cardoso, EPAL, SA, Supervisor de Laboratório de Análises de
Água da EPAL



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março 2021

Mariana Supico Santos Silva

Licenciada em Ciências de Engenharia Química e Bioquímica

Implementação e validação de um método de ensaio para análise de formaldeído em águas por SPME-GC/MS

Dissertação para obtenção do grau de mestre em Engenharia
Química e Bioquímica

Orientador: Doutor Vítor Vale Cardoso, EPAL, SA, Supervisor de Laboratório de Análises
de Água da EPAL

Coorientador: Professor Mário Eusébio, FCT/UNL, Professor auxiliar do DQ da FCT
NOVA



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março 2021

Implementação e validação de um método de ensaio para análise de formaldeído em águas por SPME-GC/MS

Copyright © 2021 por Mariana Supico Santos Silva, FCT/UNL e UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de adquirir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Este trabalho é o reflexo de um ano de aprendizagem, dedicação e partilha que, no fim, resulta na despedida da vida académica e no abraçar de novos desafios. É claro que não seria possível sem o contributo de inúmeras pessoas que, de uma forma ou de outra, permitiram alcançar este objetivo.

Antes de mais quero agradecer ao Doutor Vítor Cardoso, o meu orientador no Laboratório Central da EPAL, SA, pelo seu voto de confiança neste desafio, bem como por todo o apoio, disponibilidade e conhecimento demonstrado e transmitido ao longo deste estágio. A paciência, o acompanhamento e o interesse pelo trabalho desenvolvido foi, sem dúvida, um incentivo para a concretização do mesmo.

Ao Professor Mário Eusébio gostaria de agradecer por toda a disponibilidade, atenção e espírito crítico, pois foi um contributo muito positivo para a melhoria desta dissertação.

À Direção da EPAL quero agradecer a oportunidade que me foi concedida para realizar este estágio curricular nas suas instalações.

A todos os colaboradores da EPAL, em especial ao António Pato e à estagiária Bruna Dias, pelo auxílio e conhecimento passado em relação ao equipamento e software, durante todo o processo.

À Catarina Vitorino, Cristina Correia, Sofia Silva e Andreia Videira da equipa da Química Orgânica e à Raquel Franco da equipa da Química Inorgânica, quero agradecer pela excelente receção, integração e partilha de conhecimentos, mas também pelos momentos mais descontraídos, nos quais a alegria e diversão eram palavras de ordem.

Não menos importante, quero agradecer à minha família e amigos próximos por me terem apoiado incondicionalmente nesta longa caminhada. Em especial, os meus agradecimentos são dirigidos aos meus pais por todos os ensinamentos, companheirismo, presença e apoio ao longo de toda a minha carreira universitária e à Matilde Fanha foram fundamentais todas as horas que segredámos.

Resumo

A realização desta dissertação incidiu na implementação e validação de um método analítico para a análise de formaldeído em águas para consumo humano para concentrações de $\mu\text{g/L}$. Este método foi desenvolvido através da técnica de microextração em fase sólida para preparação da amostra e posterior análise num cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrómetro de massas (SPME-GC/MS).

A derivatização prévia na fibra com hidrocloreto de o-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzil)hidroxilamina (PFBHA) foi necessária devido à elevada polaridade e instabilidade do formaldeído. O produto da reação é uma oxima termicamente muito estável e insensível à luz.

Na otimização das condições de SPME, foram testadas várias fibras de SPME e a de divinilbenzeno polisiloxano (DVB/PDMS) foi considerada a mais apropriada para a análise deste analito. Foram estudados ainda parâmetros experimentais de SPME como o tempo e temperatura de extração, tempo de desadsorção, agitação e modo de extração.

Na validação do método, foram determinados parâmetros analíticos como a linearidade, precisão, exatidão e incertezas, onde se obtiveram coeficientes de correlação superiores a 0,990, valores de RSD inferiores a 40% em estudos de precisão, percentagens de recuperação entre 89 e 116%, com valores de RSD respetivos inferiores a 25% e incertezas inferiores a 50%.

Palavras-chave: formaldeído, PFBHA, SPME-GC/MS, derivatização, otimização, validação

Abstract

This dissertation focused on the implementation and validation of an analytical method for the analysis of formaldehyde in drinking water at $\mu\text{g/L}$ concentrations. This method was developed using a solid phase microextraction technique for sample preparation and subsequent analysis in a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer (SPME-GC/MS).

Previous on-fiber derivatization with *o*-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine hydrochloride (PFBHA) was necessary due to the high polarity and instability of formaldehyde. The product of the reaction is a very thermally stable and light-insensitive oxime.

In the optimization of SPME conditions, several fibers of SPME were tested and the divinylbenzene polysiloxane (DVB/PDMS) was deemed the most appropriate for the analysis of this analyte. Experimental parameters of SPME such as extraction time and temperature, desorption time, agitation and extraction mode were also studied.

Regarding method validation, analytical parameters such as linearity, precision, accuracy, and uncertainties were determined, where correlation coefficients over 0,990, RSD values below 40% in precision studies, recovery percentages between 89 and 116%, with respective RSD values below 25% and uncertainties below 50% were obtained.

Keywords: formaldehyde, PFBHA, SPME-GC/MS, derivatization, optimization, validation

Índice de conteúdos

1. Introdução	1
1.1. Enquadramento e objetivos	1
1.2. Legislação / Regulamentações	3
1.3. EPAL.....	3
2. Preparação da amostra.....	5
2.1. Introdução	5
2.2. Princípios da microextração em fase sólida (SPME).....	5
2.3. Otimização do processo de SPME	8
2.3.1. Seleção da fibra.....	8
2.3.2. Tempo de extração	12
2.3.3. Temperatura de extração	12
2.3.4. Tempo de desadsorção	13
2.3.5. Agitação	13
2.3.6. Modo de extração.....	14
2.3.7. <i>Salting out</i>	15
2.4. Reação de derivatização.....	15
3. Cromatografia gasosa / espetrometria de massa (GC/MS)	19
3.1. Cromatografia gasosa.....	19
3.1.1. Introdução	19
3.1.2. Componentes de um cromatógrafo gasoso	20
3.1.3. Aspetos teóricos	25
3.2. Espetrometria de massa.....	31
3.2.1. Introdução	31
3.2.2. Componentes de um espetrómetro de massa	31
3.3. Cromatografia gasosa / espetrometria de massa	36
4. Validação de métodos de ensaio.....	37
4.1. Introdução	37
4.2. Avaliação indireta	37

4.2.1.	Seletividade.....	37
4.2.2.	Precisão.....	38
4.2.3.	Quantificação	39
4.3.	Avaliação direta	44
4.3.1.	Materiais de referência certificados, MRC	44
4.3.2.	Ensaio interlaboratoriais	44
4.3.3.	Ensaio de recuperação	45
4.4.	Estimativa das incertezas	46
4.4.1.	Metodologia <i>bottom-up</i>	46
4.4.2.	Metodologia <i>top-down</i>	48
5.	Materiais e métodos	51
5.1.	Equipamento e material	51
5.2.	Reagentes	51
5.3.	Procedimento experimental.....	52
5.3.1.	Preparação da solução do reagente de derivatização	52
5.3.2.	Preparação de soluções padrão	52
5.3.3.	Condições de SPME.....	53
5.3.4.	Condições do método cromatográfico	54
6.	Apresentação e discussão dos resultados obtidos.....	57
6.1.	Identificação dos compostos em estudo.....	57
6.2.	Otimização dos parâmetros do método de SPME.....	60
6.2.1.	Tipo de fibra.....	60
6.2.2.	Tempo de extração	61
6.2.3.	Temperatura de extração.....	62
6.2.4.	Tempo de desadsorção	63
6.2.5.	Agitação	64
6.2.6.	Modo de extração.....	64
6.3.	Otimização e validação do método cromatográfico.....	65
6.3.1.	Tempo de <i>split/splitless</i>	65

6.3.2.	Estabilidade das soluções padrão.....	67
6.3.3.	Estudo de linearidade e gama de trabalho.....	67
6.3.4.	Sensibilidade do método	71
6.3.5.	Limiares analíticos	71
6.3.6.	Precisão.....	72
6.3.7.	Ensaio de recuperação	73
6.3.8.	Incertezas	75
7.	Conclusões e propostas de trabalho futuro.....	79
	Referências bibliográficas	i
	Anexo A – Máxima concentração tolerável de aldeídos	v
	Anexo B – Método dos mínimos quadrados e análise de resíduos.....	vii
	Anexo C – Teste de Mandel.....	xi
	Anexo D – Teste de <i>Rikilt</i>.....	xv
	Anexo E – Teste das áreas normalizadas	xvii
	Anexo F – Teste de homogeneidade de variâncias	xix
	Anexo G – Limiares analíticos (LOQ e LOD)	xxi
	Anexo H – Estudos com outros aldeídos	xxiii
	Anexo I – Avaliação económica	xxxi

Índice de figuras

Figura 2.1 - Processo geral de extração.	6
Figura 2.2 - Processo de desadsorção.	8
Figura 2.3 - Representação do sistema de extração em SPME	10
Figura 2.4 - Modos de extração em SPME	14
Figura 3.1 - Representação esquemática de um processo cromatográfico.....	19
Figura 3.2 - Relação entre a altura equivalente a um prato teórico, H , e a velocidade linear média para o azoto (N_2), hélio (He) e hidrogénio (H_2).....	21
Figura 3.3 - Representação de um injetor do tipo split/splitless	22
Figura 3.4 - Esquema de uma coluna capilar	23
Figura 3.5 - Estrutura geral da cadeia de polisiloxano e grupos substituintes mais comuns	23
Figura 3.6 - Modelo representativo de um cromatograma, onde t_m é o tempo morto, $t_{R(1)}$ e $t_{R(2)}$ são os tempos de retenção do primeiro e segundo pico, respetivamente, e $t'_{R(1)}$ e $t'_{R(2)}$ são os tempos de retenção ajustados dos primeiro e segundo pico, respetivamente.....	26
Figura 3.7 - Representação gráfica da equação de van Deemter	29
Figura 3.8 - Representação de uma fonte de ionização EI.....	32
Figura 3.9 - Representação de um analisador do tipo quadrupolo. O gerador de radiofrequência produz uma onda sinusoidal com amplitude, U , variável. O gerador de potencial constante produz uma voltagem, V , que altera apenas de sinal	34
Figura 3.10 - Representação esquemática de um multiplicador de eletrões: A - multiplicador contínuo; B - multiplicador discreto	35
Figura 3.11 - Esquema típico de um sistema de GC/MS	36
Figura 6.1 - Cromatograma da análise por Full scan.	57
Figura 6.2 - Espectro de massa obtido para a oxima de formaldeído.	58
Figura 6.3 - Mecanismo possível de formação do ião caraterístico m/z 181.	58
Figura 6.4 - espectro de massas obtido para o PFBHA.	58
Figura 6.5 - Mecanismo possível de formação do ião caraterístico m/z 181.	59
Figura 6.6 - Mecanismo possível de formação do ião caraterístico m/z 194.	59
Figura 6.7 - Cromatograma da análise por SIM.....	59
Figura 6.8 - Variação das áreas da oxima de formaldeído em função da fibra utilizada.	61
Figura 6.9 - Variação da área da oxima de formaldeído em função do tempo de extração.	62
Figura 6.10 - Variação da área da oxima de formaldeído em função da temperatura de extração.	63
Figura 6.11 - Variação da área da oxima de formaldeído em função do tempo de desadsorção.	63
Figura 6.12 - Variação da área da oxima de formaldeído em função da agitação utilizada.....	64
Figura 6.13 - Variação da área da oxima de formaldeído em função do volume de headspace.	65

Figura 6.14 - Variação da área da oxima de formaldeído em função do modo splitless e split.....	66
Figura 6.15 - Variação da área da oxima de formaldeído em função do tempo de splitless.....	66
Figura 6.16 - Variação da área da oxima de formaldeído em função da idade da solução padrão à temperatura ambiente e refrigerada.....	67
Figura 6.17 – Reta de calibração da oxima de formaldeído na gama de trabalho 0,5µg/L a 5µg/L.	68
Figura 6.18 – Reta de calibração da oxima de formaldeído, para a gama de trabalho 0,5µg/L a 500µg/L.....	69
Figura 6.19 - Causas prováveis para a contaminação de formaldeído nas amostras.	74
Figura 6.20 - Causas prováveis para a variabilidade dos resultados obtidos.	77
Figura B.1 - Representação gráfica da concentração da oxima de formaldeído em função dos resíduos.	x
Figuras C.1 e C.2 - Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial.	xii
Figura D.1 - Representação gráfica do teste de Rikilt.	xvi
Figura E.1 - Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados.	xviii
Figura H.1 - Cromatograma da solução conjunta de aldeídos.	xxiv
Figura H.2 - Variação das áreas dos compostos em função da fibra utilizada.....	xxiv
Figura H.3 - Variação das áreas dos compostos em função do tempo de extração.	xxv
Figura H.4 - Variação das áreas dos compostos em função da temperatura de extração.....	xxv
Figura H.5 - Variação das áreas dos compostos em função do tempo de desadsorção.....	xxv
Figura H.6 - Variação das áreas dos compostos em função da agitação utilizada.	xxvi
Figura H.7 - Variação das áreas dos compostos em função do volume de headspace.....	xxvi
Figura H.8 - Variação das áreas dos compostos em função do modo splitless e split.	xxvi
Figura H.9 - Variação das áreas dos compostos em função do tempo de splitless.	xxvii
Figura H.10 - Variação das áreas dos compostos em estudo em função da idade da solução padrão refrigerada.	xxvii
Figura H.11 - Variação das áreas dos compostos em estudo em função da idade da solução padrão à temperatura ambiente.....	xxvii
Figura H.12 – Reta de calibração da oxima de formaldeído para a gama 0,5µg/L a 5µg/L.	xxviii
Figura H.13 - Reta de calibração da oxima de acetaldeído para a gama 0,5µg/L a 5µg/L.	xxviii
Figura H.14 - Reta de calibração da oxima de propanal para a gama 0,5µg/L a 5µg/L.	xxix
Figura H.15 - Reta de calibração da oxima de butanal para a gama 0,5µg/L a 5µg/L.....	xxix

Índice de tabelas

Tabela 1.1 - Propriedades físico-químicas relevantes do formaldeído	2
Tabela 1.2 - Limites de referência para o formaldeído	3
Tabela 2.1 - Fibras comercialmente disponíveis e respectivas aplicações.	9
Tabela 2.2 - Comparação de estudos de análises de aldeídos usando a técnica SPME-GC/MS com derivatização na fibra.	11
Tabela 2.3 - Propriedades físico-químicas da oxima de pentafluorobenzilo, previstas pelo <i>software ChemDraw</i>	16
Tabela 3.1 - Detetores e respectivas características.....	24
Tabela 3.2 – Exemplos de tipos de analisadores de razões m/z.....	33
Tabela 5.1 – Preparação das soluções de calibração usadas.	53
Tabela 5.2 - Condições ótimas de SPME obtidas para o formaldeído e condições usadas para o PFBHA.....	54
Tabela 5.3 - Condições do injetor.	54
Tabela 5.4 - Condições da coluna cromatográfica.	54
Tabela 5.5 - Condições operacionais do forno para o formaldeído.	54
Tabela 5.6 - Condições operacionais do forno para o PFBHA.	55
Tabela 5.7 - Condições da interface.....	55
Tabela 5.8 - Condições do detetor.	55
Tabela 5.9 - Modo de pesquisa do MS dos compostos em estudo.....	55
Tabela 5.10 – Representação do tempo de retenção e iões de quantificação do formaldeído e PFBHA escolhidos para o modo SIM.....	55
Tabela 6.1 - Resumo dos resultados da aplicação do método dos mínimos quadrados.	69
Tabela 6.2 - Resumo dos resultados obtidos da aplicação do teste de Mandel.	70
Tabela 6.3 - Resumo dos resultados obtidos da aplicação do teste da homogeneidade das variâncias.	70
Tabela 6.4 - Sensibilidade do método.	71
Tabela 6.5 - Limites de quantificação (LOQ) e detecção (LOD) obtidos para o formaldeído através da repetibilidade.....	71
Tabela 6.6 - Limiares analíticos determinados para o padrão com concentração mais baixa da gama de trabalho.	72
Tabela 6.7 - Resultados obtidos para a repetibilidade nas duas gamas de concentração testadas.	72
Tabela 6.8 - Resultados obtidos para a precisão intermédia nas duas gamas de concentração testadas.	73
Tabela 6.9 - Percentagens de recuperação obtidas nas quatro matrizes estudadas para n=6.	75

Tabela 6.10 - Resultados obtidos para a estimativa da incerteza do método de acordo com o Guia <i>Nordtest</i>	76
Tabela 6.11 - Resultados obtidos para a estimativa da incerteza do método de acordo com o ISO 11352.	76
Tabela 6.12 - Expressão de resultados da gama de trabalho usando 1 algarismo significativo na incerteza da medição.....	77
Tabela 6.13 - Expressão de resultados da gama de trabalho usando 2 algarismos significativos na incerteza da medição.....	77
Tabela 7.1 - Resumo dos resultados obtidos da otimização do método.....	79
Tabela 7.2 - Limites de quantificação e detecção obtidos pela repetibilidade do método.	80
Tabela 7.3 - Resumo dos resultados obtidos da aplicação dos diversos testes estatísticos.	80
Tabela A.1 - Requerimentos específicos para materiais de borracha e revestimentos de resinas epoxídicas	v
Tabela A.2 - Tabela de substâncias orgânicas confirmadas que entram em contacto com a água para consumo	v
Tabela A.3 - Tabela de critérios para água para consumo humano do Standard NSF / ANSI 60	v
Tabela B.1 - Desvios relativamente à concentração-alvo para a oxima de formaldeído.	x
Tabela C.1 - áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial para a oxima de formaldeído.....	xii
Tabela C.2 e C.3 - Erros quadráticos para os dois ajustes.	xii
Tabela D.1 - Cálculo das razões para o teste de Rikilt para a oxima de formaldeído.....	xvi
Tabela E.1 – Cálculo dos valores normalizados para a oxima de formaldeído.	xvii
Tabelas F.1 e F.2 - Áreas obtidas nas duas gamas de concentração.	xx
Tabela G.1 - Áreas obtidas para o padrão da gama mais baixa.	xxi
Tabela G.2 - Concentrações obtidas para o padrão de concentração mais baixa.	xxii
Tabela H.1 – Representação dos tempos de retenção e iões de quantificação dos vários analitos escolhidos para o modo SIM.....	xxiii
Tabela I.1 - Custos dos materiais considerados para a avaliação económica do método.	xxxi

Lista de siglas e acrónimos

CAL – Companhia das Águas de Lisboa
 CAR – *carboxen*
 CI – ionização química
 CW – *carbowax*
 DL – decreto de lei
 DNPH – 2,4-dinitrofenil-hidrazina
 DVB – divinilbenzeno
 ECD – detetor por captura iónica
 EI – eletroionização
 EPAL – Empresa Portuguesa das Águas Livres
 ETA – Estação de tratamento de águas
 FID – detetor de ionização de chama
 GC – cromatografia gasosa
 GC/MS – cromatografia gasosa acoplada a espetrometria de massa
 HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência
 ISO – Organização Mundial de Normalização
 LLE – *liquid-liquid extraction* (extração líquido-líquido)
 MAC – concentração máxima aceitável
 MTC_{tap} – concentração máxima tolerável na torneira dos consumidores
 MRC – materiais de referência certificados
 MS – espetrometria de massa
 m/z – razão massa /carga
 PA – poliacrilato
 PDMS – polidimetilsiloxano
 PFBHA – hidrocloreto de o-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzilo)hidroxilamina
 RSD – desvio padrão relativo
 SA – sociedade anónima
 SIM – monitorização seletiva de iões
 S/N – razão sinal/ruído
 SPME – *solid-phase microextraction* (microextração em fase sólida)
 WHO – Organização Mundial de Saúde

Simbologia

A_{100} – área do pico correspondente à melhor correlação

A_i – área de um dado pico

b – ordenada na origem

b_i – desvio entre a recuperação de analito a 100% da amostra e a recuperação de analito obtida experimentalmente

b_{Rm} – raiz quadrada dos desvios associados aos ensaios de recuperação

C – concentração da solução padrão primária, em m/v

\bar{C} – concentração média obtida nos ensaios de recuperação efetuados, em $\mu\text{g/L}$

C_0 – concentração inicial de analito nas amostras, em $\mu\text{g/L}$

C_{100} – concentração do pico correspondente à melhor correlação, em $\mu\text{g/L}$

C_e – concentração experimental do método, em $\mu\text{g/L}$

C_f – concentração de analito no revestimento da fibra, em $\mu\text{g/L}$

C_i – concentração de um dado pico, em $\mu\text{g/L}$

c_m – concentração de um composto na fase móvel, em $\mu\text{g/L}$

C_M – termo da transferência de massa na fase móvel

C_P – concentração do padrão, em $\mu\text{g/L}$

c_s – concentração de um composto na fase estacionária, em $\mu\text{g/L}$

C_s – concentração do analito na fase aquosa, em $\mu\text{g/L}$

C_S – termo da transferência de massa na fase estacionária

C_{spike} – concentração teórica da amostra fortificada, em $\mu\text{g/L}$

CV_M – coeficiente de variação do método, %

D_f – coeficiente de difusão de um analito, em cm^2/s

DS^2 – diferença de variâncias

$F_{\text{crítico}}$ – valor tabelado da distribuição de *Fisher-Snedecor*

F_r – fator de resposta

H – altura de um prato teórico, em mm

HETP – altura equivalente a um prato teórico, em mm

k – fator de retenção

k_2 – fator de retenção do segundo pico

K – constante de distribuição

K_{fs} – coeficiente de distribuição entre o revestimento da fibra e a matriz da amostra

K_{hs} – coeficiente de distribuição entre o *headspace* e a matriz da amostra

L – comprimento da coluna, em mm

LOD – limite de detecção, em $\mu\text{g/L}$

LOQ – limite de quantificação, em $\mu\text{g/L}$

m – declive da reta de calibração

mv – massa volúmica do padrão comercial

MFP – caminho médio livre, em cm

N – número de pratos teóricos

n – número de ensaios de recuperação

n_f – quantidade de analito adsorvido pelo revestimento da fibra, em μg

P – pressão na câmara iónica, em Torr

PG – valor teste

pur – pureza do padrão comercial, em %

r – limite de repetibilidade

R – coeficiente de correlação da reta

\bar{R}_m – valor médio dos ensaios de recuperação

R_r – limite de reprodutibilidade

R_s – resolução da coluna, min/cm

S – sensibilidade

S_b – desvio padrão da ordenada na origem

$S_{\text{fort.}}$ – desvio padrão de uma série de análises de amostras fortificadas

S_m – desvio padrão do declive

S_M – desvio padrão do método

S_r – desvio padrão da repetibilidade para um nível de confiança de 95%

S_R – desvio padrão da reprodutibilidade para um nível de confiança de 95%

$S_{y/x}$ – desvio padrão residual da reta de calibração

S_{x0} – desvio padrão associado a várias leituras de padrão com a concentração mais baixa da gama de trabalho, normalmente com uma concentração vestigial

t – valor da variável de t de *Student*

t_e – tempo de equilíbrio, em min

t_m – tempo morto, em min

t_R – tempo de retenção, em min

$t_{R'}$ – tempo de retenção ajustado, em min

\bar{u} – velocidade linear média da fase móvel, em cm/s

U – incerteza expandida

u_{bias} – *bias*

u_c – incerteza combinada

$u_{(\text{Cspike})}$ – incerteza associada à fortificação da amostra

$u_{\text{exatidão}}$ – incerteza associada à exatidão

$u_{\text{fort.}}$ – incerteza associada à concentração de analito associado

u_{mv} – é a incerteza padrão associada à massa volúmica do padrão comercial

$u_{\text{prec. int.}}$ – incerteza associada à precisão intermédia

u_{pur} – incerteza associada à pureza do padrão comercial

u_{reta} – incerteza associada à interpolação da curva de calibração

$u_{V_{sv}}$ – incerteza associada à medida do volume da seringa de vidro

u_{V_b} – incerteza associada à medida do volume do balão volumétrico

V_b – volume do balão volumétrico, em mL

V_f – volume do revestimento da fibra, em L

V_h – volume no *headspace*, em L

V_m – volume da fase móvel, em L

V_s – volume da fase estacionária, em L

V_S – volume da amostra, em L

V_{sv} – volume da seringa de vidro, em mL

x – concentração dos padrões utilizados, em $\mu\text{g/L}$

\bar{x} – valor médio da concentração na solução padrão, em $\mu\text{g/L}$

x_i – valor individual de concentração na solução padrão, em $\mu\text{g/L}$

W_b – largura do pico na base, em mm

W_h – largura do pico a metade da altura máxima, em mm

y – sinal instrumental

\bar{y} – valor médio do sinal instrumental

y_i – valor individual do sinal instrumental

$\bar{y}_{i(2^\circ)}$ – sinal estimado pela função polinomial de calibração

ΔC – variação da concentração que está associada à variação do sinal de resposta

ΔL – variação do sinal analítico obtido

α – fator de separação (seletividade)

1. Introdução

1.1. Enquadramento e objetivos

A água é um recurso precioso, essencial para a existência do Homem e das suas atividades económicas. Com o aumento constante da população, e sendo a água um recurso limitado, é necessário entender a influência humana na quantidade e qualidade da água.

O primeiro registo desta influência foi a 4000 A.C, com métodos para melhorar o sabor e o odor da água. Escrituras antigas em sânscrito e grego recomendavam filtrar a água com carvão, expô-la à luz solar, fervê-la ou drená-la como tratamento.

Em 1500 A.C., os egípcios utilizavam alúmen para filtrar as partículas suspensas, mas apenas durante o século XVIII a filtração foi estabelecida como um método eficaz de remover partículas da água.

Em 1855, a compreensão sobre as fontes e efeitos dos contaminantes das águas para consumo humano foi alargada devido ao epidemiologista Dr. *John Snow*, o qual provou que a cólera era uma doença transmitida pela água. No final do século XIX, *Luis Pasteur* demonstrou a transmissão de doenças causadas por micróbios através da água, na sua “teoria dos germes”, o que levou, nas décadas seguintes, os cientistas descobrirem que a turvação da água não era apenas um problema estético, mas que as partículas dessa água poderiam conter patogénicos. Como resultado, o foco das estações de tratamento de águas passou a ser redução da turvação, por filtração lenta com areias.

Enquanto a filtração é um método efetivo para reduzir a turvação, foi a desinfecção com cloro que desempenhou o maior papel em reduzir o número de surtos de doenças provenientes da água. No século XX, introduziu-se a desinfecção com ozono na Europa (1).


Apesar dos benefícios do cloro e do ozono como desinfetantes, há formação de subprodutos de desinfecção. Os principais subprodutos de desinfecção por ozono são os aldeídos, peróxidos e epóxidos orgânicos, que resultam da reação entre o ozono e compostos aromáticos, aminoácidos e polipeptídeos presentes na água (2–5). Em anos recentes, os aldeídos de baixa massa molecular, como o formaldeído, estão a receber mais atenção por serem os grandes subprodutos da ozonização de águas naturais.

Deste modo, o formaldeído presente na água de consumo humano surge principalmente da oxidação de substâncias orgânicas naturais durante os processos de ozonização e cloração. Este pode ainda surgir durante a lixiviação de acessórios de plástico à base de poliacetal em que o revestimento de proteção se tenha quebrado (6) ou pelo facto de se poder libertar de borrachas e resinas epoxídicas usadas nos sistemas de abastecimento de águas (7).

A presença deste composto em águas para consumo humano é importante devido aos seus efeitos adversos na saúde humana, pois o formaldeído é considerado um composto mutagénico e carcinogénico (6).

O formaldeído é geralmente gasoso à temperatura ambiente, incolor, com um odor acre, elevada volatilidade e extremamente inflamável e reativo (8). Algumas propriedades deste composto relevantes para este trabalho experimental encontram-se descritos na tabela 1.1.

Tabela 1.1 - Propriedades físico-químicas relevantes do formaldeído (8).

Propriedades formaldeído	
Fórmula molecular	CH ₂ O
Estrutura química	
Massa molecular	30
Massa específica (g/mL)	1,09
Ponto de ebulição (°C)	-19,1
Solubilidade em água (mg/mL)	400
Pressão de vapor (kPa)	0,2
Coeficiente de partição (logK _{oa})	-0,65
Momento dipolar (D)	2,3

Os aldeídos geralmente não conseguem ser identificados por métodos analíticos que envolvem passos típicos de pré-concentração, como é o caso do SPME-GC/MS, por serem tão polares. Para além da sua polaridade, os aldeídos são também altamente voláteis e reativos, podendo sofrer uma série de reações de autoassociação e, reagindo com água, formar vários compostos químicos com propriedades diferentes das substâncias monomoleculares puras. Por estes motivos, é necessário derivatizar o formaldeído antes de o analisar de modo a garantir recuperações e sensibilidades satisfatórias (2,9).

Tendo todos estes fatores em consideração, torna-se clara a importância da implementação, otimização e validação de um método para análise do formaldeído que permita a sua deteção e quantificação em águas para consumo humano, águas superficiais e subterrâneas.

1.2. Legislação / Regulamentações

Apesar do seu consumo e formação, os aldeídos ainda não são regidos pela legislação devido ao facto de ocorrerem em águas de consumo em concentrações bem abaixo do considerado perigoso para a saúde (10), sendo que os intervalos típicos de concentração do formaldeído em águas de consumo é de não detetável (N.D.) a grandeza $10^1 \mu\text{g/L}$ (11).

No entanto, foi determinado, pela iniciativa 4MS da *Umwelt Bundesamt*, que a concentração máxima tolerável de formaldeído que pode chegar à torneira dos consumidores é de 0,75 mg/L devido à sua libertação de materiais de borracha e de resinas epoxídicas presentes nos sistemas de abastecimento de água (12).

De acordo com a norma NSF/ANSI 60 de 2016, relativa aos efeitos na saúde humana dos químicos adicionados à água durante o seu tratamento, a concentração máxima admissível de formaldeído nas águas é de 1 mg/L, como indicado na tabela 1.2 (13).

Tabela 1.2 - Limites de referência para o formaldeído (10,12–14).

Composto	Valor paramétrico (mg/L) (DL 103/2010)	Valor guia (mg/L) (WHO)	Valor guia (mg/L) (Iniciativa 4MS)	Valor guia (mg/L) (NSF/ANSI 60)
Formaldeído	s/ limite	s/ limite	0,75	1

1.3. EPAL

A EPAL, atualmente Empresa Portuguesa das Águas Livres, S.A., é a sucessora da Companhia das Águas de Lisboa (CAL), que entre 1868 e 1974 se limitava ao abastecimento e distribuição de água ao concelho de Lisboa. A área de atividade desta empresa tem aumentado de tal modo que, juntamente com as Águas do Vale do Tejo, de momento abrange 87 municípios, ocupando 33% do território continental português e servindo 3,5 milhões de habitantes, sendo assim a maior empresa nacional no setor de abastecimento de água e a maior empresa do Grupo Águas de Portugal.

A empresa tem também como responsabilidade a gestão do Sistema Multimunicipal de Abastecimento de Água e Saneamento de Lisboa e Vale do Tejo, incluindo a captação, produção, transporte e distribuição de água para consumo humano. O sistema de abastecimento de água da EPAL possui no seu sistema de produção, um subsistema de captação que compreende duas fontes superficiais

localizadas na Albufeira de Castelo de Bode e no rio Tejo, em Valada, a primeira representando cerca de 75% da capacidade total de produção da empresa. Para além destas fontes, a EPAL possui ainda várias outras captações subterrâneas, nomeadamente os poços das Lezírias, Alenquer e Ota.

Para além do fornecimento de água à população, a EPAL presta também serviços de análise e controlo laboratorial, aferição e reparação de contadores e monitorização de redes de distribuição. Existem duas instalações laboratoriais incumbidas de analisar as águas desde a sua captação até à torneira dos consumidores, uma localizada em Lisboa e a outra na ETA de Vale da Pedra.

De modo a cumprir todos os requisitos para a qualidade das águas e a garantir a competência do tratamento de água realizado, estes laboratórios são acreditados pela Norma NP EN ISO/IEC 17025, sendo analisados 110 parâmetros da qualidade da água correspondendo a 198 compostos e realizados 135 métodos analíticos para ensaios nas áreas da Química orgânica, inorgânica e microbiologia (15).

Para a EPAL é importante estar sempre um passo à frente, sendo que dos compostos analisados nem todos são regidos por lei, como é o caso dos aldeídos. O formaldeído foi elegido por pertencer a um grupo de compostos, os aldeídos, candidato na lista de contaminantes para legislação (16) e por se considerar pertinente fazê-lo após a avaliação de estudos da sua concentração e riscos (12).

Deste modo, é necessário desenvolver um método robusto para estudar a evolução do aumento da concentração deste composto nas diferentes fontes de captação, tratamento e até mesmo nos sistemas de abastecimento de águas.

2. Preparação da amostra

2.1. Introdução

O objetivo de um estudo analítico é obter informação sobre um objeto ou substância. A substância pode ser um sólido, líquido, gás ou um material biológico. Um meio de investigar substâncias presentes em matrizes líquidas é a extração acoplada de uma análise cromatográfica.

A maioria das amostras têm de ser previamente preparadas antes da sua introdução nos equipamentos a utilizar. Os processos da preparação dependem da amostra, da matriz e do nível de concentração à qual a análise deve ser realizada. O objetivo final é a obtenção de uma solução enriquecida com os analitos de interesse, garantindo uma melhor sensibilidade do método de ensaio (17).

As técnicas de extração mais utilizadas são a extração líquido-líquido e extração em fase sólida. No entanto, estas técnicas têm limitações no que toca à automatização da extração, limpeza da amostra, isto é, à quantidade de potenciais interferentes na análise cromatográfica, e ao uso de solventes, muitas vezes tóxicos (18).

Como tentativa de melhorar as limitações das técnicas previamente usadas, *Pawliszyn* e os seus colaboradores criaram, em 1989 (19,20), a técnica de microextração em fase sólida (SPME) que, num único passo de amostragem, integra a amostragem, extração e concentração da amostra. Esta técnica é isenta de solventes orgânicos, sendo esta uma das suas principais vantagens, assim como a sua fácil utilização, aplicabilidade a diversos tipos de analitos, diminuição substancial dos tempos de análise, maior capacidade de automatização no que toca à preparação das amostras e custos de processo mais baixos (21).

2.2. Princípios da microextração em fase sólida (SPME)

O princípio base da técnica de extração por SPME é usar uma pequena quantidade de fase de extração, que pode ser tanto um líquido polimérico de elevada massa molecular ou um sorvente sólido, de alta porosidade. A configuração geométrica do SPME utiliza uma fibra de sílica fundida, normalmente com 1 cm de comprimento e 0,11 mm de diâmetro externo, revestida por um filme polimérico e ligada a um êmbolo de aço inoxidável no qual está instalado um suporte semelhante a uma seringa.

A microextração em fase sólida consiste numa sequência de procedimentos, podendo estes ser divididos em dois processos principais: extração dos analitos da amostra pelo revestimento da fibra e desadsorção dos analitos extraídos. Estes processos estão representados nas figuras 2.1 e 2.2, respetivamente (22).

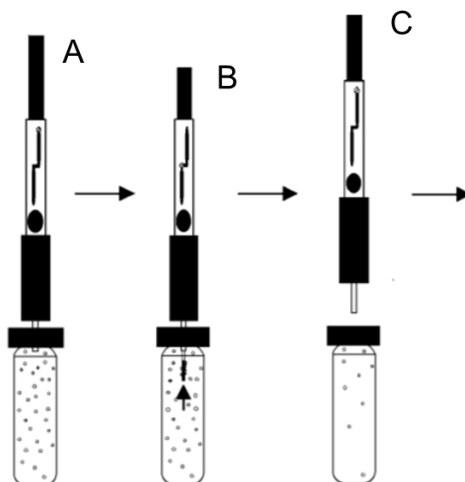


Figura 2.1 - Processo geral de extração: A - perfuração do septo do vial; B - exposição da fibra; C - recolha da fibra. Adaptado de (23).

No primeiro processo referido, os analitos são extraídos até o sistema atingir um equilíbrio. O equilíbrio forma-se entre três fases: do revestimento da fibra para a fase aquosa, do headspace para a fase aquosa e do revestimento da fibra para o headspace.

Há três modos de extração que podem ser usados em SPME: extração direta, em headspace e envolvendo proteção por membrana, descritos no subcapítulo 2.3.7.

Na extração direta, o termo do *headspace* não é considerado e considera-se apenas que o equilíbrio é formado entre a solução aquosa e a fibra. A quantidade de analito extraído pelo revestimento da fibra em equilíbrio é determinada pela magnitude do coeficiente de distribuição, K_{fs} , do analito entre a matriz da amostra e o revestimento da fibra, sendo este dado pela equação 2.1.

$$K_{fs} = \frac{c_f^\infty}{c_s^\infty} \quad (2.1)$$

Onde,

K_{fs} é o coeficiente de distribuição entre o revestimento da fibra e a matriz da amostra

c_f^∞ é a concentração de equilíbrio do analito no revestimento da fibra, em $\mu\text{g/L}$

c_s^∞ é a concentração de equilíbrio do analito na fase aquosa, em $\mu\text{g/L}$

O K_{fs} é um parâmetro característico que descreve as propriedades do revestimento da fibra e a sua seletividade em relação a um analito específico, versus outros componentes da matriz. Na prática, significa que uma vez que o equilíbrio foi atingido, a quantidade extraída é constante dentro dos limites

do erro experimental e é independente de aumentos adicionais do tempo de extração. As condições de equilíbrio podem ser descritas pela equação 2.2.

$$n_f = C_0 \frac{K_{fs} V_f V_s}{K_{fs} V_f + V_s} \quad (2.2)$$

Onde,

n_f é a quantidade de analito adsorvido pelo revestimento da fibra, em mol

C_0 é a concentração inicial de analito nas amostras, em $\mu\text{g/L}$

V_f é o volume do revestimento da fibra, em L

V_s é o volume da amostra, em L

Quando o volume da amostra é bastante superior ao volume da fase estacionária, isto é, o seu volume é relativamente infinito em relação ao volume do revestimento da fibra ($V_s \gg K_{fs} V_f$), a equação 2.2 pode ser simplificada na 2.3.

$$n_f = K_{fs} V_f C_0 \quad (2.3)$$

Nesta equação, a quantidade de analito extraído é independente do volume da amostra.

No caso da extração ser efetuada em *headspace*, passa-se a considerar o equilíbrio trifásico e a quantidade de analito adsorvido pela fibra é dada pela equação 2.4.

$$n_f = \frac{K_{fs} V_f V_s C_0}{K_{fs} V_f + K_{hs} V_h + V_s} \quad (2.4)$$

Onde,

K_{hs} é o coeficiente de distribuição entre o *headspace* e a matriz da amostra

V_h é o volume no *headspace*, em L

Os termos do denominador representam a capacidade de conter o analito na fibra ($K_{fs} V_f$), no *headspace* ($K_{hs} V_h$) e na própria amostra (V_s) (18,22,24).

Depois da extração dos analitos da amostra, faz-se a desadsorção dos analitos extraídos de modo a libertá-los do revestimento da fibra. Se a técnica por SPME for feita em conjunto com GC/MS, ocorre uma desadsorção térmica, expondo a fibra a temperaturas altas, na gama dos 100°C a 300°C, de modo a volatilizar os analitos e convertê-los em gás (25).

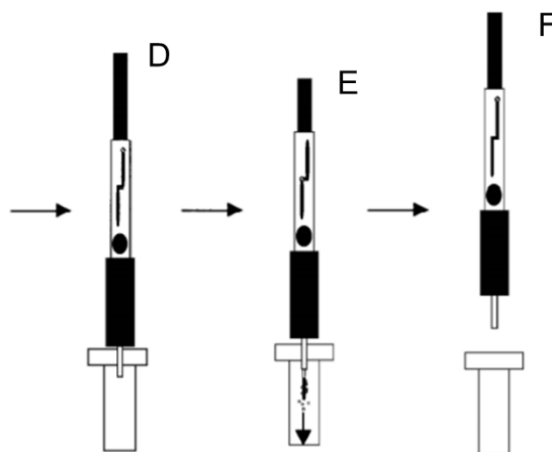


Figura 2.2 - Processo de desadsorção: D - Introdução da agulha no injetor; E - desadsorção dos analitos; F - recolha da seringa. Adaptado de (23).

2.3. Otimização do processo de SPME

O êxito do desenvolvimento de um método por SPME depende da otimização dos parâmetros escolhidos para a extração e desadsorção, que, se devidamente otimizados, deverão garantir uma boa precisão e exatidão, juntamente com limites de detecção mínimos (18).

O método a ser desenvolvido nesta dissertação vai envolver uma reação de derivatização na fibra, isto é, vai-se adsorver o reagente de derivatização à superfície da fibra e, imediatamente após, adsorve-se o composto em análise de modo que a reação ocorra na superfície da fibra.

De modo a garantir o sucesso deste método, vários parâmetros são estudados e otimizados de acordo com as propriedades intrínsecas dos analitos em estudo, como a volatilidade, solubilidade, afinidade para com o revestimento da fibra, entre outros. Os parâmetros a ser estudados e otimizados são, normalmente, a seleção do tipo de fibra, o tempo de extração e de desadsorção, a temperatura de extração, o modo de agitação e extração e a adição de sal.

2.3.1. Seleção da fibra

A seleção do revestimento é baseada na sua seletividade para certos tipos de analitos alvo de acordo com o peso molecular, polaridade, volatilidade e concentração dos compostos (26). Os analitos apolares são mais eficientemente extraídos por revestimentos apolares e o mesmo princípio é aplicado para analitos polares e semipolares. Em SPME, como apenas 1 cm da fibra está exposta à matriz da amostra, a natureza do revestimento da fibra pode ser apolar, semipolar ou polar, uma vez que tanto a matriz como o revestimento da fibra estão a competir pela maior afinidade aos analitos (18).

Há vários tipos de revestimentos de fibras, variando em polaridade, espessura da fase estacionária e comprimento do revestimento. As fibras de fase única, como polidimetilsiloxano (PDMS) e poliacrilato (PA) pertencem ao grupo de revestimentos líquidos, enquanto fibras de fase mista, como PDMS/divinilbenzeno (DVB), *carbowax* (CW)/PDMS, *carboxen* (CAR)/PDMS e PDMS/DVB/CAR pertencem ao grupo dos revestimentos sólidos. Os diferentes tipos de fibras e as suas respectivas aplicações encontram-se na tabela 2.1 (21,22).

Tabela 2.1 - Fibras comercialmente disponíveis e respectivas aplicações. Adaptado de (17).

Revestimento	Espessura (μm)	Aplicações
PDMS	100	GC/HPLC para voláteis
PDMS	30	GC/HPLC para semi-voláteis apolares
PDMS	7	GC/HPLC para compostos apolares de elevado peso molecular
PDMS/DVB	65	GC/HPLC para voláteis, aminas e nitroaromáticos
PA	85	GC/HPLC para semi-voláteis polares
CW/PDMS	65, 70	GC/HPLC para álcoois e compostos polares
CAR/PDMS	75, 85	GC/HPLC para gases e compostos de baixo peso molecular
PDMS/DVB/CAR	50/30	GC/HPLC para compostos aromatizantes
PDMS/DVB	60	HPLC para aminas e compostos polares

De acordo com as informações apresentadas na tabela 2.1, deduz-se que a fibra que maior afinidade tem não só para o formaldeído, mas também para o reagente de derivatização será a de 65 μm PDMS-DVB.

A seletividade e o tempo de extração do método são determinados tanto pela espessura do revestimento como pela constante de distribuição. No caso de revestimentos sólidos, se estes forem muito espessos a extração ocorre apenas na superfície do revestimento. Por haver uma área de superfície disponível limitada para a adsorção, quando o tempo de extração é maior pode haver desadsorção dos analitos com menor afinidade da fibra novamente para o *headspace* ou para a matriz. Se esta área superficial está substancialmente ocupada, a quantidade extraída em equilíbrio pode variar com concentrações tanto do analito alvo como de outros analitos existentes na matriz (24).

Na figura 2.3 está representado o sistema de extração em SPME. No caso de se considerar que a amostra é perfeitamente agitada, isto é, que a fase da amostra se move muito rapidamente em respeito à fibra para que todos os analitos presentes na amostra tenham acesso ao revestimento da fibra, o tempo de equilíbrio, t_e , definido como o tempo requerido a extrair 95% da quantidade de equilíbrio de um analito da amostra, corresponde a:

$$t_e = t_{95\%} = \frac{2(b-a)^2}{D_f} \quad (2.5)$$

Onde,

a é o raio interno do revestimento, em μm

b é o raio externo do revestimento, em μm

$(b - a)$ é a espessura do revestimento da fibra, em μm

D_f é o coeficiente de difusão de um analito, em $\mu\text{m}^2/\text{s}$

A partir da equação 2.5, pode-se estimar o tempo de equilíbrio mais curto possível para o sistema prático (18).

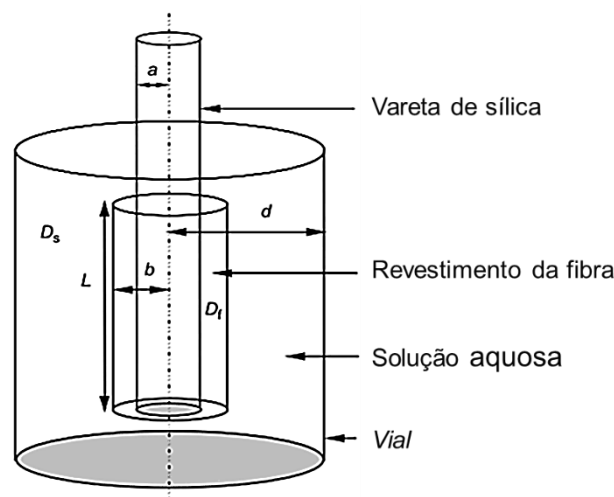


Figura 2.3 - Representação do sistema de extração em SPME: a - raio interno do revestimento; b - raio externo do revestimento; L - comprimento do revestimento; d - raio interno do vial; D_s - coeficiente de difusão do analito no revestimento; D_f - coeficiente de difusão do analito na amostra. Adaptado de (21).

Tabela 2.2 - Comparação de estudos de análises de aldeídos usando a técnica SPME-GC/MS com derivatização na fibra.

Estudo	Matriz	Compostos carbonilo alvo	Método de análise	Reagente de derivatização	Extração aldeído	Desadsorção aldeído	LOD/ ppb(v)
Trenholm <i>et al.</i> , 2008 (27)	Água residual	C1	SPME GC-MS (TIC/SIM)	PFBHA $t_{eq}=4\text{min}$ $t_{ads}=4\text{min}$ Ag.=500rpm	$t_{eq}=15\text{min}$ $t_{ads}=25\text{min}$ $T_{ext}=50^{\circ}\text{C}$ Ag.=750rpm	$t_{desad}=7\text{min}$ $T_{injetor}=250^{\circ}\text{C}$ Split 25:1	3,1
Martos <i>et al.</i> , 1998 (28)	Ar	C1	SPME GC-MS/FID	PFBHA $t_{eq}=10\text{s}$ $t_{ads}=2\text{min}$ -	- $t_{ads}=10\text{min}$ $T_{ext}=25^{\circ}\text{C}$ -	- $T_{injetor}=210^{\circ}\text{C}$ -	4,6
Wang <i>et al.</i> , 2005 (9)	Aglomerados, vinho e peixe	C1 – C9 Etanal Hexanal	SPME GC-MS/FID	PFBHA $t_{eq}=1\text{min}$ $t_{ads}=5\text{min}$ Ag.=250rpm	$t_{eq}=1\text{min}$ $t_{ads}=5\text{min}$ $T_{ext}=50^{\circ}\text{C}$ Ag.=500rpm	$t_{desad}=5\text{min}$ $T_{injetor}=250^{\circ}\text{C}$ Split 50:1	2–5 0,5 0,5
Tsai <i>et al.</i> , 2003 (29)	Água (bi-destilada, de poço, da torneira clorada)	C1 – C5	SPME GC-MS (TIC/SIM)	PFBHA $t_{eq}=5\text{min}$ $t_{ads}=2\text{min}$ Ag.=1100rpm	- $t_{ads}=10\text{min}$ - -	$t_{desad}=2\text{min}$ $T_{injetor}=250^{\circ}\text{C}$ Split 20:1	0,12–0,34
Cancho <i>et al.</i> , 2001 (2)	Água (torneira)	C2 – C10 Glioxal Metilglioxal	SPME GC-ECD	PFBHA - - -	- $t_{ads}=15\text{min}$ $T_{ext}=\text{amb.}$ -	$t_{desad}=1\text{min}$ $T_{injetor}=250^{\circ}\text{C}$ Split 125:1	0,04–0,16 0,4 0,3
Bao <i>et al.</i> , 1998 (30)	Água (bi-destilada, clorada da torneira, chuva)	C1 – C10 Propenal 2-butenal 2-hexenal Benzaldeído Acetona 2-butanona 2-pentanona Glioxal Metilglioxal	SPME GC-ECD	PFBHA $t_{eq}=5\text{min}$ - -	$t_{eq}=10\text{min}$ $t_{ads}=30\text{min}$ - -	$t_{desad}=5\text{min}$ $T_{injetor}=300^{\circ}\text{C}$ -	0,006–0,2
Sugaya <i>et al.</i> , 2001 (11)	Água (torneira, mineral)	C1 – C4	SPME HS-GC-MS (TIC/SIM)	PFBOA - - -	$t_{eq}=60\text{min}$ - $T_{ext}=60^{\circ}\text{C}$ -	- - -	0,3–0,5

2.3.2. Tempo de extração

O tempo de extração ou adsorção é definido como o tempo necessário para se alcançar o equilíbrio entre a matriz e o revestimento da fibra.

Após atingir este equilíbrio, obtém-se um tempo de extração otimizado, em que a quantidade de analito extraída mantém-se constante independentemente do aumento do tempo de extração e dentro do limite do erro experimental.

Ao construir o perfil de tempos de extração, é necessário ter em atenção que, por vezes, há uma diminuição substancial do declive da curva de analito extraído em função do tempo de extração, que pode ser incorretamente aceite como o tempo de equilíbrio. Este fenómeno ocorre quando se trabalha em extração por *headspace*, onde há um aumento rápido da curva de equilíbrio, correspondendo apenas à extração do analito presente na fase gasosa, seguido por um aumento muito lento relacionado com a transferência do analito, através do *headspace*, até ao revestimento da fibra.

Em equilíbrio, pequenas variações do tempo de extração não afetam a quantidade de analito extraída pela fibra. Por outro lado, na zona de maior declive da curva, como não está em equilíbrio, até pequenas variações no tempo de extração podem resultar em grandes variações da quantidade extraída. Quanto menor é o tempo de extração, maior é o erro relativo (17,18).

Neste estudo, para a análise de uma amostra extrai-se primeiro um *vial* com reagente de derivatização e depois um com a amostra aquosa. Através dos dados expostos nos artigos da tabela 2.2 espera-se que o tempo necessário para se atingir o equilíbrio do primeiro *vial* seja curto, 1-5 minutos, uma vez que o reagente de derivatização está muito concentrado. Espera-se também que o segundo *vial* tenha um tempo de extração superior ao primeiro, entre 5 e 30 min, visto que, para além de se necessitar garantir o equilíbrio, é necessário garantir a reação do reagente de derivatização com o aldeído em estudo.

2.3.3. Temperatura de extração

A temperatura de extração tem um papel importante nas condições de otimização do método de SPME. Um aumento da temperatura causa um aumento da velocidade de extração e uma simultânea diminuição da constante de distribuição, isto é, diminui a concentração de analito na fase aquosa. Este princípio é aplicado sobretudo no modo de extração por imersão direta, pois há evaporação dos analitos devido às altas temperaturas levando à diminuição da concentração dos mesmos na matriz.

Em alternativa, na extração por *headspace* o aumento da temperatura vai influenciar a pressão de vapor dos analitos, dado que vai haver movimento dos analitos presentes na matriz da amostra para o

headspace, o que, por sua vez, contribui para o contacto dos mesmos com o revestimento da fibra e favorecendo o coeficiente de distribuição relativo ao *headspace* (21).

Com base em estudos semelhantes, tabela 2.2, prevê-se que a temperatura para todo o processo de extração esteja entre a temperatura ambiente e os 50 °C.

2.3.4. Tempo de desadsorção

Após a extração, segue-se a desadsorção dos analitos por GC. O tempo de desadsorção deve ser suficiente para que os compostos sejam desadsorvidos na totalidade da fibra de forma a não haver transferência de analitos em injeções posteriores e não comprometer os resultados obtidos. Para tal, estima-se um tempo de desadsorção entre 5 e 7 minutos (pelos estudos apresentados na tabela 2.2), não só para desadsorver completamente o analito, mas também para recondicionar a fibra entre extrações consecutivas de modo a diminuir os interferentes e o *carry-over* para as amostras seguintes.

Há vários fatores que influenciam o tempo necessário para desadsorver os analitos de interesse e transferi-los para o sistema de separação/detecção. No caso de desadsorção térmica na entrada do GC, os principais fatores que influenciam a velocidade de transferência dos analitos são a temperatura de ebulição do analito, a espessura do revestimento da fibra e a temperatura do injetor (21,23).

2.3.5. Agitação

A agitação é um parâmetro semelhante à temperatura de extração, onde o tempo requerido para se atingir o equilíbrio pode ser reduzido ao usar um modo apropriado de agitação, tornando, assim, a extração mais eficiente.

A agitação de uma amostra favorece o transporte de massa entre a amostra e o revestimento da fibra. Quanto mais eficiente for a agitação, menores são os tempos de extração requeridos para se atingir o equilíbrio.

Em amostras gasosas, o tempo necessário para se atingir o equilíbrio é geralmente curto, pois é limitado apenas pela velocidade de difusão dos analitos no revestimento da fibra, necessitando de pouca ou nenhuma agitação. Deste modo, como na extração por *headspace* a maioria dos analitos já se encontram na fase gasosa, as amostras não são normalmente agitadas. Na extração por imersão direta é necessária agitação para promover uma maior facilidade na transferência de massa entre a amostra e a fibra.

Em ensaios manuais, o modo de agitação mais utilizado é a agitação magnética, em que se coloca um agitador magnético dentro do vial que contém a amostra. Pode também ser utilizada agitação com *vórtex*, que reproduz um movimento circular no vial, agitação por ultrassons, agitação intrusiva, agitação de fluxo contínuo, agitação orbital e vibração da fibra (17,18,21).

Em ensaios automatizados, a agitação é assistida pelo equipamento como é o caso presente (9,27). A utilização do agitador do equipamento, se este estiver a operar na sua capacidade máxima, vai permitir eliminar o erro humano e obter melhores precisões.

2.3.6. Modo de extração

Como está ilustrado na figura 2.4, a extração em SPME pode ser efetuada por três formas distintas: por imersão direta, por *headspace* ou com recurso a uma membrana protetora.

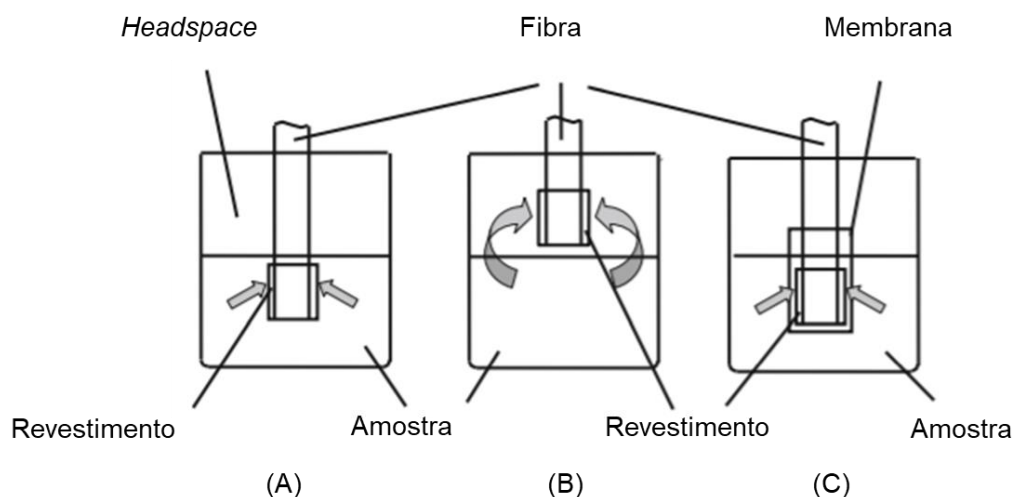


Figura 2.4 - Modos de extração em SPME: A - imersão direta; B - *headspace*; C - com membrana protetora. Adaptado de (21).

Na imersão direta, a fibra é imersa na amostra e os analitos são transportados diretamente da matriz da amostra para a fase de extração.

Na extração por *headspace*, os analitos são extraídos da fase aquosa para um *headspace* acima da matriz da amostra. Este modo de extração é vantajoso porque protege a fibra de efeitos adversos causados por substâncias não voláteis e de peso molecular elevado presentes na matriz da amostra.

A seleção do modo de extração é baseada na composição da matriz, na volatilidade do analito e na afinidade do mesmo pela matriz. Para analitos com volatilidades médias a altas, é preferível a extração

por imersão direta. Para analitos com volatilidades elevadas, utiliza-se a extração por *headspace*, pois os tempos de extração são mais curtos neste modo de extração do que na imersão direta.

Como já foi referido, neste trabalho é necessário uma reação de derivatização, para a qual é requerido um reagente de derivatização. Com base nos estudos apresentados na tabela 2.2, de modo a impedir o contacto direto do reagente com a fibra do SPME para evitar contaminações e danos à fibra, vai-se testar apenas a extração por *headspace*.

Na terceira forma de extração, uma membrana seletiva separa a fibra da amostra aquosa, deixando passar os analitos gasosos, mas bloqueando interferências. A membrana tem como principal objetivo proteger a fibra dos efeitos adversos causados por compostos com altos pesos moleculares quando são analisadas amostras muito sujas, com um elevado número de compostos interferentes. Apesar da extração por *headspace* ter o mesmo propósito, a membrana protetora permite analisar compostos com volatilidades inferiores (18,21).

2.3.7. *Salting out*

A adição de sal aumenta a força iónica da solução aquosa de uma amostra, podendo levar à redução da solubilidade dos analitos presentes na matriz, o que conduz a uma mais fácil migração dos analitos para o *headspace*. A extração dos analitos pode, então, tornar-se mais eficiente com a adição de sal, especialmente em compostos polares e voláteis.

No entanto, a adição de sal não é um requerimento para o melhoramento da extração, sendo que, se a solução aquosa tiver altas constantes de distribuição (explicadas no subcapítulo 3.1.3.), este parâmetro pode até introduzir picos interferentes (21,23).

Em relação ao aldeído a ser estudado neste trabalho, é possível que haja um aumento da eficiência da extração com a adição de sal, uma vez que este tem uma solubilidade em água elevada (2,11,29).

No entanto, neste estudo não se vai analisar o comportamento da extração com a adição de sal já que existe a possibilidade de esta vir a afetar a reação e, por outro lado, o sinal cromatográfico é alto o suficiente para que não haja necessidade de fazer o *salting out* para facilitar a migração dos compostos para o *headspace*.

2.4. Reação de derivatização

A alta polaridade e reatividade de compostos com um grupo carbonilo em matrizes aquosas torna necessária a derivatização antes da sua deteção por técnicas cromatográficas (2).

A volatilidade de um composto é essencial para a sua análise por cromatografia gasosa e a derivatização transforma compostos polares, como é o caso do formaldeído, em compostos suficientemente voláteis de forma a poderem ser eluídos a temperaturas razoáveis sem sofrerem decomposição térmica ou rearranjo molecular. Geralmente, a derivatização é usada para melhorar a aptidão, eficiência e detetabilidade do GC (31).

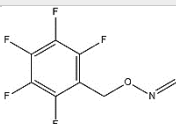
Os aldeídos são compostos que podem sofrer adsorção em colunas cromatográficas, levando a que os picos cromatográficos apresentem um *tailing* significativo, o que contribui para uma diminuição da sensibilidade do método de ensaio.

A derivatização de aldeídos contribui para formar compostos que são menos adsorvidos pela coluna cromatográfica, contribuindo para o aumento da sensibilidade do método (32,33).

O reagente de derivatização deve ser carregado reversivelmente na fibra de SPME selecionada e o produto da reação entre o reagente de derivatização e o carbonilo deve ser termicamente estável e possível de analisar por cromatografia gasosa.

Para compostos com um grupo carbonilo, pode-se usar hidrocloreto de o-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzil) hidroxilamina (PFBHA), 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH), entre outros, como reagentes de derivatização. Após vários estudos para a análise de formaldeído por SPME, apresentados na tabela 2.2, conclui-se que o melhor reagente de derivatização a usar neste trabalho é o PFBHA, que quando reage com aldeídos forma uma oxima termicamente muito estável e insensível à luz, como pretendido (28). Algumas propriedades pertinentes às oximas formadas encontram-se na tabela 2.3.

Tabela 2.3 - Propriedades físico-químicas da oxima de pentafluorobenzilo, previstas pelo software ChemDraw.

Oxima o-pentafluorobenzilo de formaldeído	
Fórmula molecular	C ₈ H ₄ F ₅ NO
Estrutura química	
Massa molecular	225
Ponto de ebulição (°C)	249,04
Coefficiente de partição (logK _{oa})	2,49

O processo de SPME foi desenvolvido para abordar a necessidade de facilitar a preparação de amostras e diminuir os interferentes na análise das mesmas, razão pela qual se irá derivatizar os compostos em estudo diretamente na fibra do equipamento (24).

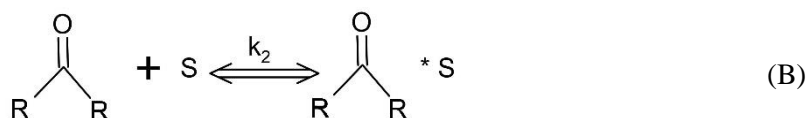
No método a ser desenvolvido, a taxa geral de formação de oxima no revestimento das fibras em função da concentração de composto carbonilo gasoso pode ser descrita em quatro passos.

O primeiro passo (A) consiste em carregar o revestimento da fibra com PFBHA.



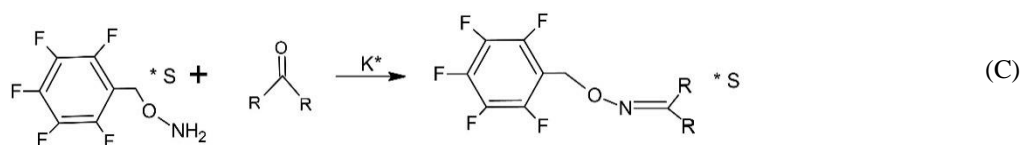
Onde S é a superfície disponível da fibra. Imediatamente após este passo, a constante aparente de desadsorção é insignificante ($k_1 \gg k_{-1}$).

O segundo passo a considerar (B) é a possibilidade de uma molécula de composto carbonilo gasosa se ligar a superfícies desocupadas.



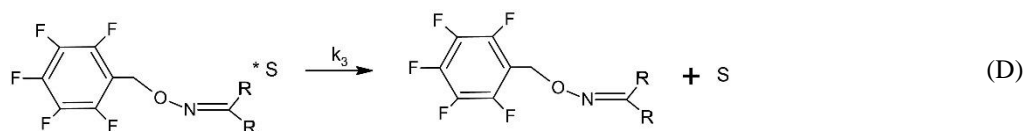
Neste passo, espera-se que a constante de adsorção do composto carbonilo seja muito pequena ($k_2 \approx 0$), tendo em conta que as superfícies de possível sorção já vão estar ocupadas pelo reagente de derivatização.

No terceiro passo a ponderar, assume-se que é a parte aromática do PFBHA que providencia a maioria da afinidade de ligação ao polímero do revestimento da fibra, enquanto a parte da hidroxilamina está livre para reagir com o composto carbonilo que se aproxima. A constante de reação entre o PFBHA sorvido e o composto carbonilo gasoso é K^* e assume-se que esta limita a velocidade da reação.



O último passo é a desadsorção da oxima. Compreende-se que a oxima formada tem uma afinidade muito forte para com o revestimento da fibra, assumindo-se, assim, que $k_3 \approx 0$. A adsorção de novos

carbonilos gasosos é impedida devido à presença de oxima*S, o que reduz a constante geral aparente da reação. A redução desta constante é possível porque quando o número de moléculas disponíveis de PFBHA diminui, diminui também a possibilidade de uma reação entre o PFBHA extraído e novas moléculas de composto carbonilo. O objetivo é minimizar a quantidade de PFBHA consumido na reação e, ao mesmo tempo, obter uma quantidade suficiente de oxima para ser detetada (28).



3. Cromatografia gasosa / espetrometria de massa (GC/MS)

3.1. Cromatografia gasosa

3.1.1. Introdução

A cromatografia é uma técnica analítica usada para identificar, determinar e separar compostos voláteis e termicamente estáveis de misturas complexas.

Todos os tipos de cromatografia envolvem a distribuição, ou partição, de uma mistura entre duas fases distintas, uma móvel e outra estacionária. Em cromatografia gasosa, a amostra é injetada na fase móvel, geralmente um gás inerte. Nesta fase, os compostos da mistura movimentam-se através da fase estacionária que se encontra fixa no interior de uma coluna.

A coluna encontra-se dentro de um forno com programação de temperatura. A velocidade de migração de cada componente e, como consequência, o seu tempo de retenção na coluna será função da sua distribuição entre a fase móvel e a fase estacionária.

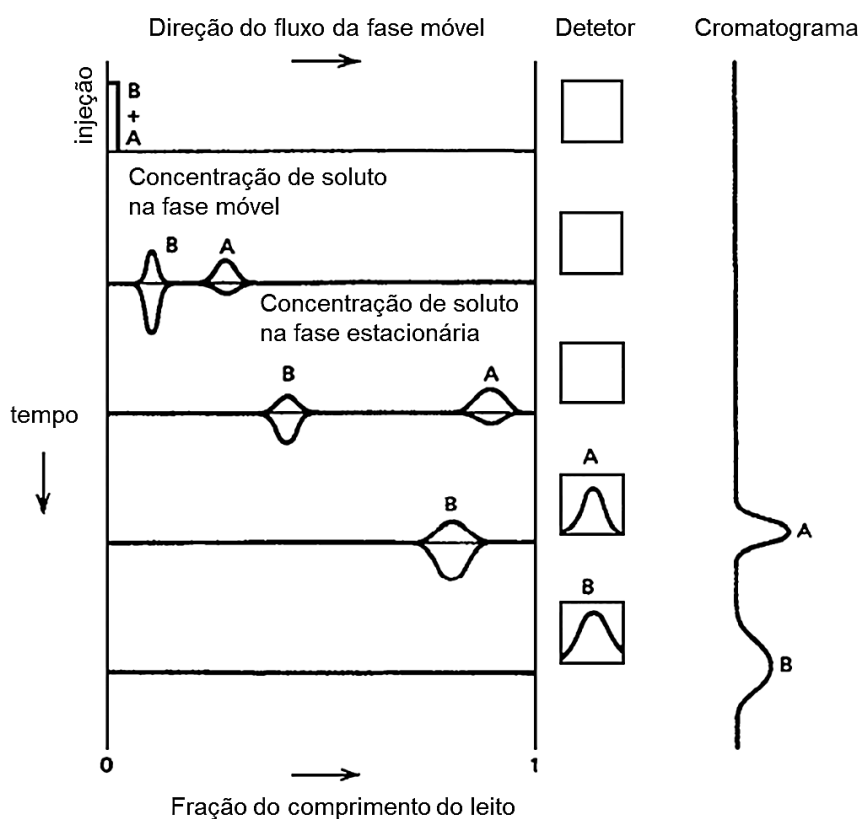


Figura 3.1 - Representação esquemática de um processo cromatográfico. Adaptado de (34).

À medida que a amostra é transportada pela fase móvel sobre um leito fixo de fase estacionária, cada um dos seus compostos vai ficar retido em diferentes extensões devido às suas diferentes adsorções e vão ficar fisicamente separados. Aqueles com maiores adsorções na fase estacionária levam mais tempo a emergir do leito do que os com adsorções mais baixas. Um fator chave deste equilíbrio é a pressão de vapor dos compostos, em geral, quanto maior a pressão de vapor, menor o tempo de retenção na coluna. Como consequência desta diferença de mobilidade, os diversos componentes da amostra separam-se em bandas que se podem analisar tanto qualitativa como quantitativamente mediante a função dos detetores selecionados. Este processo de separação é designado por eluição e pode ser observado na figura 3.1 (34,35).

3.1.2. Componentes de um cromatógrafo gasoso

Seis elementos fundamentais constituem um cromatógrafo gasoso: o gás de transporte, o injetor, o forno, a coluna, o detetor e a unidade de aquisição de dados e controlo.

- **Gás de transporte ou de arraste**

O gás de transporte ou de arraste providencia um fluxo contínuo de fase móvel pela coluna, que é essencial para o transporte de analitos pela coluna. O gás de arraste deve ser inerte e o seu estado físico-químico deve, no maior grau possível, ser mantido constante enquanto flui através da coluna e do detetor de modo a impedir a presença de contaminantes nos mesmos. Hélio, hidrogénio e azoto ultrapuros são os gases mais utilizados como gases de arraste.

Dois conceitos essenciais para a separação cromatográfica são o tipo de gás de arraste e a sua velocidade linear. A velocidade linear média da fase móvel, \bar{u} , encontra-se expressa na equação 3.1.

$$\bar{u} = \frac{L}{t_m} \quad (3.1)$$

Onde,

\bar{u} é a velocidade linear média do gás de arraste, em cm/s;

L é o comprimento da coluna, em mm;

t_m é o tempo morto, em min.

O desempenho de uma coluna de empacotamento pode ser avaliado a partir da equação de *van Deemter* (explicada com mais detalhe no subcapítulo seguinte). As curvas de *van Deemter* são geradas pelo gráfico da altura dos pratos teóricos em função da velocidade linear média e podem-se observar, para três gases de arraste distintos, na figura 3.2.

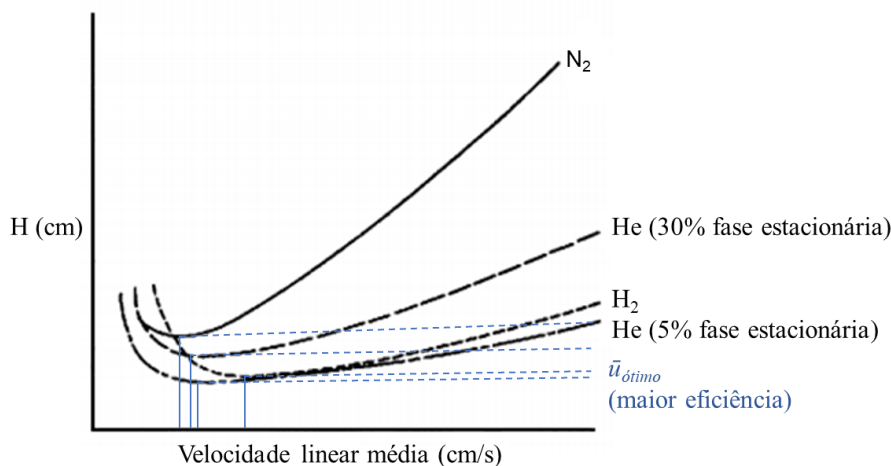


Figura 3.2 - Relação entre a altura equivalente a um prato teórico, H , e a velocidade linear média para o azoto (N_2), hélio (He) e hidrogénio (H_2). Adaptado de (35).

Pela figura 3.2 pode-se verificar que para a altura mínima, H_{\min} , de cada gás existe uma velocidade linear média ótima, $\bar{u}_{\text{ótimo}}$, correspondente. Quanto menor H_{\min} , maior é o número de pratos teóricos e maior é o potencial de separação. Quanto maior $\bar{u}_{\text{ótimo}}$, menor é o tempo de análise, o que geralmente resulta em maiores sensibilidades. Pode-se, ainda, observar um melhoramento no desempenho da coluna ao reduzir a espessura do filme de fase estacionária de 30% para 5% (35).

Tendo em consideração estes fatores, seria o hidrogénio que providenciaria uma melhor eficiência da coluna. No entanto, devido ao facto de este ser explosivo, o hélio é o gás de arraste mais utilizado, incluindo neste estudo (35–37).

• **Injetor**

Diferentes separações requerem diferentes métodos de introduzir a matriz a ser separada na coluna cromatográfica. Esta introdução deve ser alcançada na fase gasosa, em quantidades adequadas e com a maior brevidade possível. A substância deve-se encontrar em condições de equilíbrio e tanto esta como a sua introdução devem ser reprodutíveis com o maior grau de precisão possível.

Existem três técnicas básicas de injeção de amostras (líquidas ou gasosas) em colunas capilares: *split*, *splitless* ou em coluna. As duas primeiras consistem em injetar, através de um septo de borracha, e vaporizar a amostra numa câmara de vaporização, onde se encontra um *liner* aquecido a uma temperatura que permite a vaporização da amostra. O gás de arraste é também introduzido nesta câmara onde é misturado com a amostra. A representação esquemática de um injetor *split/splitless* encontra-se na figura 3.3.

O sistema *split* desvia a maior parte de uma amostra para fora do sistema cromatográfico e envia apenas uma pequena fração para a coluna. A razão de *split* indica a proporção aproximada da partição da amostra. O *split* é a técnica de escolha para amostras bastante concentradas, por vezes permitindo a injeção de amostras não diluídas.

O modo *splitless* dirige toda a amostra para a coluna, pelo que é mais adequado para a análise de compostos vestigiais ou com pontos de ebulição elevados.

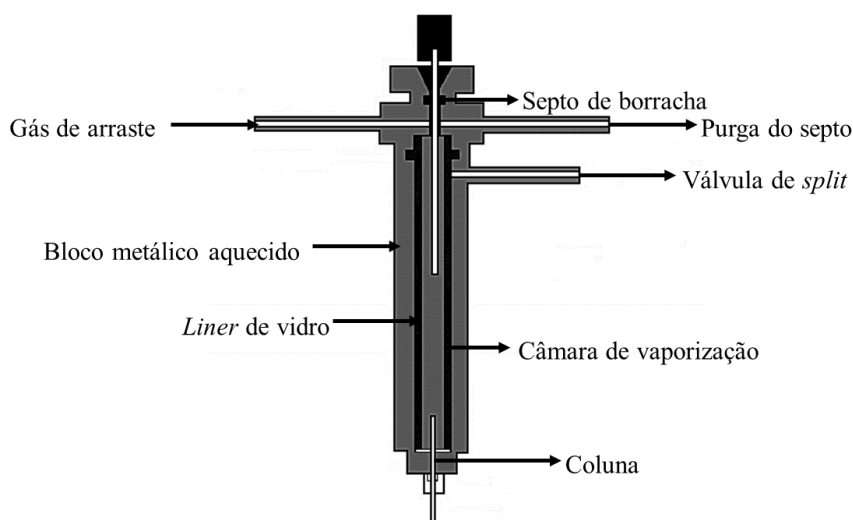


Figura 3.3 - Representação de um injetor do tipo *split/splitless*. Adaptado de (38).

A injeção em coluna é feita à temperatura ambiente, eliminando a etapa de vaporização que poderia levar à decomposição de compostos termolábeis (36,39).

É de notar que, neste trabalho, faz apenas sentido otimizar a injeção por *split/splitless*, uma vez que os compostos em estudo não se decompõem com a temperatura.

- **A coluna cromatográfica**

O principal objetivo desta técnica analítica é conseguido na coluna cromatográfica através da separação de misturas nos seus compostos individuais. Esta é selecionada com base nos compostos alvo, no número de compostos em análise e na configuração do instrumento.

Podem ser usadas colunas de enchimento ou colunas capilares com fases estacionárias sólidas ou líquidas.

As colunas de enchimento podem ser produzidas em aço inoxidável, vidro ou alumínio e têm tipicamente um comprimento entre 0,6 e 6 metros e um diâmetro interno entre 0,002 e 0,004 metros. O

enchimento destas colunas é constituído por pequenas partículas esféricas e uniformes, revestidas com uma camada de fase estacionária.

Em GC, geralmente são usadas as colunas capilares, cujos comprimento e diâmetro interno podem estar compreendidos entre 25 e 150 metros e 0,25 a 0,75 metros, respetivamente. Estas colunas são constituídas por um tubo de sílica fundida, cuja parede interna está quimicamente ligada à fase estacionária e cujo exterior é revestido por uma resina de poliimida. Uma representação da constituição de uma coluna capilar pode ser observada na figura 3.4.

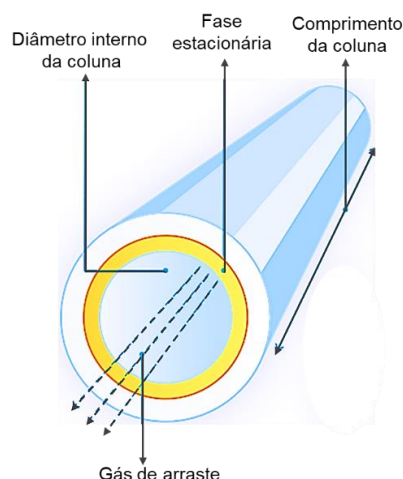


Figura 3.4 - Esquema de uma coluna capilar. Adaptado de (40).

Para além do seu tamanho, as colunas capilares são diferenciadas pela sua fase estacionária. Esta deve formar um filme de espessura uniforme que cobre completamente a superfície de suporte e que é tão inerte o quanto possível. O filme deve ser termicamente estável tanto para evitar a decomposição como para possibilitar a vaporização à temperatura necessária para conduzir a análise. A fase estacionária que melhor cumpre estes requisitos é a que possui uma cadeia principal em polisiloxano, representada na figura 3.5 (35,40).

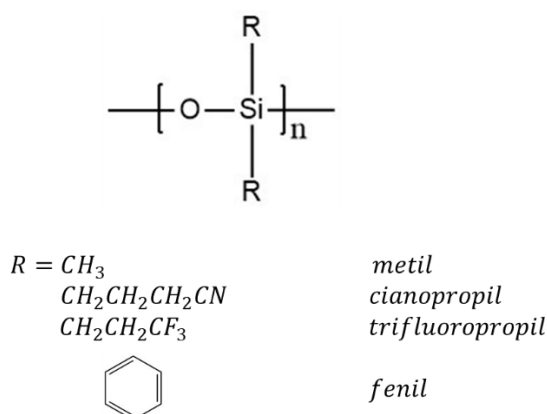


Figura 3.5 - Estrutura geral da cadeia de polisiloxano e grupos substituintes mais comuns. Adaptado de (41).

- **O forno**

A coluna cromatográfica está instalada dentro do forno, cuja temperatura é controlada com elevada precisão por ser um dos parâmetros mais importantes na separação por GC ao alterar a seletividade da fase estacionária para com os analitos e, subsequentemente, o tempo de retenção dos mesmos.

O forno providencia um aumento da temperatura da coluna, o que causa uma eluição mais rápida dos analitos, com consequentes tempos de retenção menores.

Para além da temperatura da coluna, as rampas de temperatura do forno têm ainda um impacto significativo na separação. O aumento das rampas de temperatura, pode reduzir o poder de separação da coluna e pode levar a uma maior temperatura de eluição dos compostos, o que, por sua vez, pode diminuir os seus tempos de retenção (42).

- **O detetor**

O detetor é um dispositivo usado para detetar os analitos eluídos à saída da coluna cromatográfica. A partir desta deteção é produzido um sinal elétrico, na maioria dos casos amplificado, que é enviado para o sistema de aquisição de dados, onde é produzido o cromatograma.

O detetor deve garantir que os valores independentes das substâncias a ser analisadas, como a pressão, temperatura e fluxo de gás de arraste não apresentam grandes interferências na leitura do sinal elétrico, deve garantir que a relação sinal elétrico/concentração dos analitos seja linear e deve garantir uma sensibilidade elevada.

A escolha do detetor depende do tipo de aplicação pretendida, sendo que os detetores mais utilizados se encontram na tabela 3.1 (36,39). O detetor a utilizar neste trabalho é o espectrómetro de massas, que será mais detalhadamente abordado no subcapítulo 3.3.

Tabela 3.1 – Tipos de detetores. Adaptado de (40).

Detetor		Exemplos de compostos detetáveis
Detetor de ionização de chama	FID	Compostos orgânicos
Espectrómetro de massas	MS	Moléculas ionizáveis
Detetor de captura eletrónica	ECD	Compostos orgânicos halogenados

- **Unidade de aquisição de dados e controlo**

Este último parâmetro tem como função registar, guardar e analisar os dados produzidos de modo a concretizar o objetivo de identificação de analitos numa amostra. Para tal, o processamento de dados deve seguir os seguintes critérios: determinação correta do espectro de massa dos compostos individuais a serem identificados e cálculo preciso da abundância dos picos cromatográficos dos analitos de cada amostra. A execução destes critérios pode ter vários impedimentos devido à possível coeluição de dois ou mais picos cromatográficos no mesmo cromatograma e variação dos tempos de retenção do mesmo composto entre amostras.

A unidade de aquisição de dados e controlo recorre ainda a bases de dados de referência, como a desenvolvida pela NIST, para a identificação dos analitos e *softwares* para o controlo e manipulação de variáveis, como a temperatura do forno, velocidade do fluxo de gás de arraste ou escolha do modo *split/splitless*, que podem auxiliar na resolução dos impedimentos acima descritos (43,44).

3.1.3. Aspetos teóricos

De modo a compreender o comportamento de um cromatógrafo gasoso é necessário considerar e otimizar os conceitos teóricos ligados ao seu funcionamento de modo a se obter os melhores resultados analíticos possíveis.

- **Constante de distribuição (K)**

Um composto sujeito ao processo de cromatografia gasosa, após injeção na coluna, é imediatamente distribuído entre a fase móvel e a fase estacionária. A repartição entre as duas fases é dada pela constante de distribuição, K , representada matematicamente para equação seguinte.

$$K = \frac{c_s}{c_m} \quad (3.2)$$

Em que,

c_s é a concentração de um composto na fase estacionária, em $\mu\text{g/L}$

c_m é a concentração de um composto na fase móvel, em $\mu\text{g/L}$

A magnitude de K é influenciada somente pelas propriedades do composto, pelo tipo de fase estacionária e pela temperatura da coluna. Para a separação ser bem-sucedida, cada analito deve apresentar um valor de K diferente, caso contrário, os compostos apresentam o mesmo tempo de retenção e ocorre co-eluição (37,39).

- **Tempo de retenção (t_R)**

O tempo total de retenção de um analito é definido como o tempo que este demora a percorrer a coluna cromatográfica. Num cromatograma, este é o tempo entre a injeção da amostra e o aparecimento do pico cromatográfico máximo e pode ser descrito matematicamente pela equação 3.3.

$$t_R = t_m + t'_R \quad (3.3)$$

Onde,

t_R é o tempo de retenção, em min

t_m é o tempo morto, em min

t'_R é o tempo de retenção ajustado, em min

O tempo morto é o tempo que o analito passa na fase móvel e pode ser determinado diretamente pelo tempo de eluição do soluto que não interage com a fase estacionária. O tempo de retenção ajustado representa o tempo em que o analito permanece na fase estacionária (42). A distinção entre os três tempos está ilustrada na figura 3.6.

O tempo de retenção depende da interação do analito com a fase estacionária, do fluxo da fase móvel e do comprimento da coluna. Se a fase móvel se move lentamente ou se a coluna é comprida, tanto o tempo de retenção como o tempo morto terão valores elevados (42).

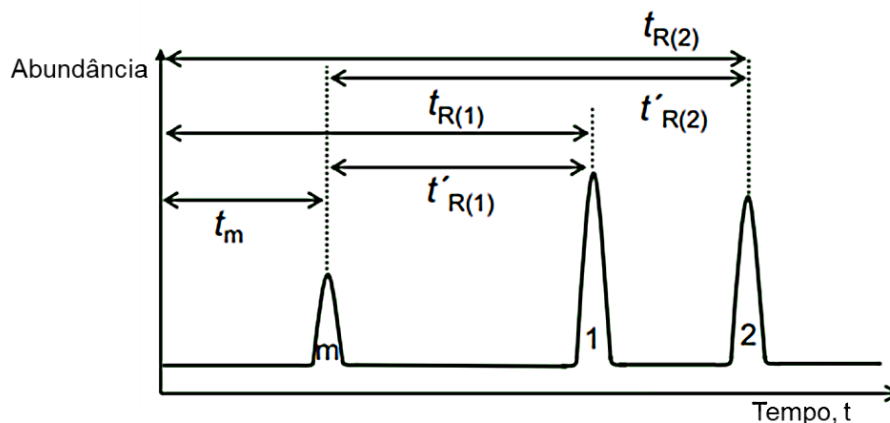


Figura 3.6 - Modelo representativo de um cromatograma, onde t_m é o tempo morto, $t_{R(1)}$ e $t_{R(2)}$ são os tempos de retenção do primeiro e segundo pico, respetivamente, e $t'_{R(1)}$ e $t'_{R(2)}$ são os tempos de retenção ajustados dos primeiro e segundo pico, respetivamente. Adaptado de (39).

- **Fator de retenção (k)**

O fator de retenção, k , dado pela equação 3.4, é um valor adimensional e representa o tempo que o soluto é retido na fase estacionária comparado com o tempo necessário para transportar o soluto através da coluna.

$$k = \frac{t'_R}{t_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (3.4)$$

O valor de k é independente do fluxo da fase móvel e do comprimento da coluna, como pretendido. Valores elevados de k significam longos tempos de análise.

O fator de retenção está, também, relacionado com o coeficiente de partição, como descrito matematicamente na equação 3.5, tornando-o diretamente proporcional ao volume de fase estacionária (39,42).

$$k = K * \frac{V_s}{V_m} = \frac{c_s V_s}{c_m V_m} \quad (3.5)$$

Onde,

V_s é o volume da fase estacionária, em L

V_m é o volume da fase móvel, em L

- **Fator de separação (α)**

Dois analitos são coeluídos numa coluna cromatográfica se apresentarem o mesmo tempo de retenção, o que significa que não houve separação. A separação requer, assim, diferentes tempos de retenção, sendo que quanto maior a diferença maior é a eficiência da separação ou a seletividade da fase estacionária para o respetivo par de analitos. Esta seletividade é expressa pelo fator de separação, α , e representa a razão do tempo de retenção na fase estacionária de dois analitos com picos cromatográficos adjacentes, sendo expresso pela equação seguinte.

$$\alpha = \frac{t'_{R(2)}}{t'_{R(1)}} = \frac{k_2}{k_1} = \frac{K_2}{K_1} \quad (3.6)$$

De forma a garantir a separação, α tem de ser superior a 1, o que significa que, para dois picos consecutivos, o tempo de retenção na fase estacionária do segundo pico tem de ser superior ao do primeiro pico (39).

- **Eficiência da coluna (N)**

A coluna cromatográfica consiste em várias secções consecutivas, chamadas de pratos teóricos, em que para cada prato se assume um equilíbrio entre o analito nas fases estacionária e móvel. O comprimento de cada secção da coluna é chamado de altura equivalente a um prato teórico, HETP, ou simplesmente altura do prato, H , e pode ser expresso pelo seguinte modo.

$$H = \frac{L}{N} \quad (3.7)$$

Onde,

H é a altura de um prato teórico, em mm

L é o comprimento da coluna, em mm

N é o número de pratos teóricos

Quanto menor a altura do prato teórico, maior é o número de pratos por metro e maior é a eficiência da coluna. As variáveis H e N dependem da temperatura da coluna, da velocidade média do gás de arraste e das propriedades dos analitos, sendo por isso determinadas em condições isotérmicas.

O número de pratos teóricos representa a eficiência da coluna e pode ser calculado conforme a equação 3.8.

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2 \quad (3.8)$$

Onde,

t_R é o tempo de retenção, em min

W_b é a largura do pico na base, em mm

Para picos assimétricos, é usada a largura do pico a metade da altura, como está representado na seguinte equação.

$$N = 5,545 \left(\frac{t_R}{W_h} \right)^2 \quad (3.9)$$

Onde,

W_h é a largura do pico a metade da altura máxima, em mm

Apesar do cálculo de H permitir determinar a eficiência da coluna, este não contabiliza os processos de difusão que levam ao alargamento dos picos. Para tal, surge a teoria de *van Deemter*, que expressa a altura de um prato teórico em colunas de enchimento pela seguinte equação.

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C\bar{u} \quad (3.10)$$

Onde,

\bar{u} é a velocidade linear média da fase móvel, em cm/s

A é o termo da difusão de *Eddy*, em mm

B é o termo da difusão longitudinal, em cm²/s

C é o termo de transferência de massa, em s

O termo A refere-se ao alargamento do pico cromatográfico causado por efeitos de dispersão, também chamados de difusão de *Eddy*. Este termo é independente da velocidade linear.

O termo B corresponde ao alargamento dos picos por difusão longitudinal, isto é, à difusão em direção e contra a direção do fluxo. B diminui com o aumento de \bar{u} e o seu impacto é menos pronunciado em taxas de fluxo elevadas.

O termo C corresponde ao alargamento dos picos cromatográficos originado pelo atraso do soluto devido à transferência de massa entre as fases estacionária e móvel e aumenta com o aumento da velocidade linear média.

Para uma melhor compreensão, a representação gráfica da equação de *van Deemter* encontra-se na figura 3.7.

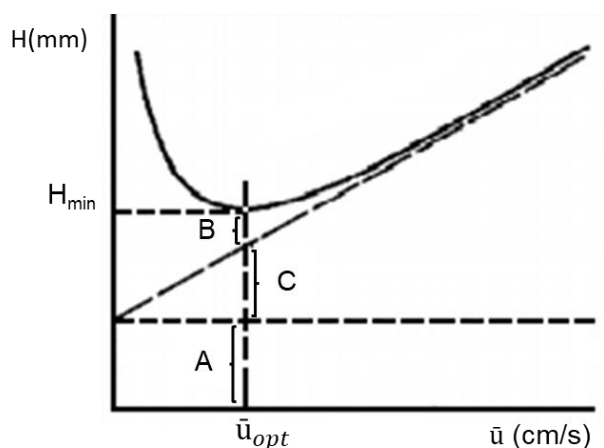


Figura 3.7 - Representação gráfica da equação de *van Deemter*. Adaptado de (35).

Para colunas capilares, recorre-se à equação condensada de *Golay*, equação 3.11, para o cálculo da altura de cada prato teórico.

$$H = \frac{B}{\bar{u}} + (C_S + C_M)\bar{u} \quad (3.11)$$

Onde,

C_S é o termo da transferência de massa na fase estacionária, em s

C_M é o termo da transferência de massa na fase móvel, em s

O termo C_M foi introduzido para contabilizar o alargamento dos picos cromatográficos causados pela difusão na fase gasosa.

Como mencionado no subcapítulo anterior, para garantir uma maior eficiência da coluna, deve-se obter picos cromatográficos estreitos, ou seja, valores pequenos de H . Para tal, os termos A , B e C devem ser

maximizados ao garantir um equilíbrio entre um elevado número de pratos e tempos de análise aceitáveis (34,39,42).

- **Resolução da coluna (R_S)**

Os parâmetros anteriores descrevem o comportamento de um analito através da coluna. No entanto, como o objetivo da cromatografia é separar os componentes de misturas, é necessário ainda descrever o grau de separação destes componentes. A resolução da coluna, R_S , representa o grau de separação de dois picos adjacentes e, para picos com alturas semelhantes e sem arrastamentos, é dada pela equação 3.12.

$$R_S = 2 \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{w_{b(2)} + w_{b(1)}} \quad (3.12)$$

Onde,

R_S é a resolução da coluna

$t_{R(1)}$ é o tempo de retenção do primeiro pico, em min

$t_{R(2)}$ é o tempo de retenção do segundo pico, em min

$w_{b(1)}$ é a largura da base do primeiro pico, em mm

$w_{b(2)}$ é a largura da base do segundo pico, em mm

Para se aumentar a resolução de um par de picos não separados completamente ou se reduz a largura do pico ao melhorar a eficiência da coluna ou se aumenta a distância entre os picos ao aumentar a seletividade da fase estacionária para cada pico. A relação da resolução com a seletividade é dada pela equação 3.13.

$$R_S = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_2}{k_2 + 1} \right) \quad (3.13)$$

Onde,

N é o número de pratos teóricos

α é o fator de separação (seletividade)

k_2 é o fator de retenção do segundo pico

Os três termos anteriores têm de ser maximizados para se obter a melhor resolução possível. Aumentando o comprimento da coluna, aumenta-se o número de pratos teóricos; diminuindo a temperatura da coluna ou alterando a composição da fase estacionária, aumenta-se a seletividade; e

aumentando a espessura do filme ou diminuindo o diâmetro da coluna, aumenta-se o fator de retenção. Contudo, k deve ser contido entre 2 e 5, pois fatores de retenção pequenos dificultam a separação e valores muito grandes não melhoram significativamente a resolução, resultando apenas em tempos de análise desnecessariamente elevados (39).

3.2. Espetrometria de massa

3.2.1. Introdução

A espetrometria de massas distingue-se por ser uma das técnicas analíticas mais completas, permitindo obter informações de cariz qualitativo e quantitativo de misturas complexas.

Dentro do espectrômetro de massas, procede-se à ionização da amostra mediante diferentes métodos. O método de ionização mais utilizado é a eletroionização, EI, que bombardeia as moléculas com eletrões de uma certa energia, capazes de provocar a perda de eletrões e formação de iões radicais positivos.

Para além de moléculas ionizadas ou iões moleculares (M^+), também se formam iões fragmentados devido à decomposição dos iões moleculares com excesso de energia. O tipo e proporção relativa de cada um destes fragmentos é caraterístico das moléculas analisadas e das condições do processo de ionização. Uma vez ionizadas, as moléculas aceleram e são conduzidas até ao analisador de massas, mediante a aplicação de certas voltagens. A velocidade alcançada por cada ião será dependente da sua massa. A deteção consecutiva dos iões formados a partir das moléculas da amostra produz o espectro de massas da substância, que é diferente para cada composto químico e que constitui uma identificação praticamente inequívoca do composto analisado.

Todos os espectrômetros de massa funcionam sob vácuo de modo a permitir a chegada dos iões ao detetor sem colisão com outras moléculas gasosas. Estas colisões poderão levar à desfragmentação dos iões e a um desvio na sua trajetória, aumentando a complexidade do espectro e diminuindo a fiabilidade e reprodutibilidade dos resultados (45,46).

3.2.2. Componentes de um espectrômetro de massa

Um espectrômetro de massa contém sempre uma fonte de ionização para produzir iões a partir da amostra, um ou mais analisadores de razões m/z para separar os iões formados e um detetor para quantificar os iões que emergem do último analisador.

- **Fonte de ionização**

Antes da análise e detecção dos componentes de uma amostra é necessário ionizá-los. Em GC/MS podem ser utilizadas duas técnicas de ionização de moléculas: a eletroionização, já referida, e a ionização química, CI.

Na fonte de EI, elétrons de um filamento incandescente, normalmente constituído por uma liga de tungsténio-rénio, vão ser focados através de uma câmara e atraídos por um eletrodo com um potencial de 70 eV e as moléculas de analito vaporizadas são bombardeadas, causando ionização e a perda de um elétron. Este é o processo mais utilizado nos instrumentos GC/MS e a representação do seu mecanismo encontra-se na figura 3.8.

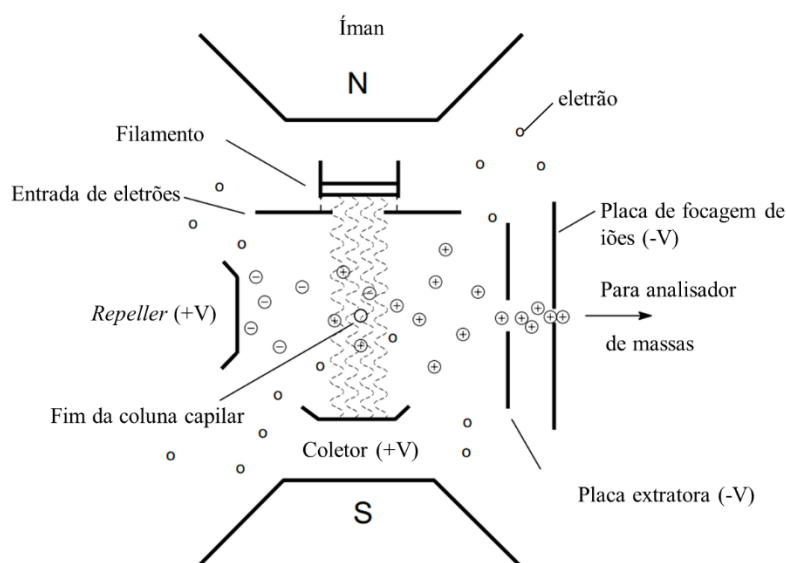


Figura 3.8 - Representação de uma fonte de ionização EI. Adaptado de (45).

Quando uma substância é introduzida na câmara em quantidade suficiente para aumentar a pressão, o eletrodo e as moléculas colidem, causando uma série de fragmentações. Os elétrons a 70 eV têm energia suficiente para quebrar as ligações de uma molécula, fazendo com que algumas delas percam um elétron e fiquem positivamente carregadas.

Para produzir espectros de massas representativos e reprodutíveis, é necessário aumentar a pressão até pelo menos 10^{-5} Torr. O caminho livre médio, MFP, de um íon ou molécula a essa pressão excede as dimensões da câmara iónica e pode ser calculado pela equação 3.14.

$$MFP = \frac{5 \times 10^{-3}}{P} \quad (3.14)$$

Onde,

MFP é o caminho médio livre, em cm

P é a pressão na câmara iônica, em Torr

Isto leva as moléculas e íons formados a colidirem apenas com as paredes da câmara, onde, por sua vez, são sujeitos a um campo magnético que promove a sua migração para o analisador de razões sem interromper os efeitos de colisão e reação.

A ionização química é uma técnica que produz íons com pouco excesso de energia, por isso, esta técnica apresenta a vantagem de obter um espectro com menos fragmentações no qual as espécies moleculares são facilmente reconhecidas (35,46).

- **Analisador de massas**

A mistura de íons moleculares e íons fragmentados que sai da fonte de ionização necessita de ser separada e identificada de forma correta de acordo a sua razão massa/carga (m/z). Esta razão resulta da imposição de um campo elétrico ou magnético, dependendo do analisador escolhido. Na tabela 3.2, encontram-se alguns exemplos de analisadores, sendo que o mais utilizado em combinação com GC é o quadrupolo.

Tabela 3.2 – Exemplos de tipos de analisadores de razões m/z . Adaptado de (46).

Tipo de analisador	Símbolo	Princípio de separação
Setor elétrico	E ou ESA	Energia cinética
Setor magnético	B	Momento
Quadrupolo	Q	m/z (estabilidade da trajetória)
Captura iônica (<i>ion trap</i>)	IT	m/z (frequência de ressonância)
<i>Time of flight</i>	TOF	Velocidade
<i>Fourier transform ion cyclotron resonance</i>	FT-ICR	m/z (frequência de ressonância)
<i>Fourier transform orbitrap</i>	FT-OT	m/z (frequência de ressonância)

O quadrupolo é um dispositivo que usa a estabilidade das trajetórias em campos elétricos oscilatórios para separar íons de acordo com as suas razões m/z .

Este analisador, cuja representação esquemática se encontra na figura 3.9, é constituído por quatro hastes elétricas estrita e paralelamente alinhadas entre si, de forma a que o feixe de iões procedente da fonte de ionização incida sobre o centro do dispositivo.

Sobre estas hastes, em polos opostos, aplica-se, em sobreposição, um potencial constante e um potencial alternado de radiofrequência. Nenhum destes campos elétricos tem efeito sobre o movimento longitudinal dos iões individualmente, mas a sua combinação origina um movimento lateral complexo.

Os movimentos dos iões dependem da razão m/z , existindo apenas uma pequena gama de frequência em que a trajetória de um determinado ião é estável. Fora desta gama, a trajetória dos restantes iões leva-os a chocar contra qualquer haste, neutralizando-se.

As principais vantagens deste analisador são a sua fácil utilização, a sua compatibilidade com inúmeras outras técnicas analíticas e a possibilidade de escolha entre o processo de monitorização de iões seleccionados, SIM, ou realizar um varrimento contínuo, *full scan*.

O modo SIM permite que os iões apresentem valores específicos de razões m/z para atravessar o analisador enquanto todos os outros são rejeitados. Este processo permite aumentar a sensibilidade do método analítico ao detetar baixas concentrações de compostos em amostras.

No modo *full scan*, é efetuado um varrimento total dos iões obtidos por fragmentação das moléculas presentes na amostra e a informação obtida nesta análise é representada através de um espetro de massa.

A principal desvantagem é que tem uma resolução relativamente pequena, limitando a sua gama de utilização, sendo que só permite a separação de iões com razões m/z inferiores a 1000 (45,46).

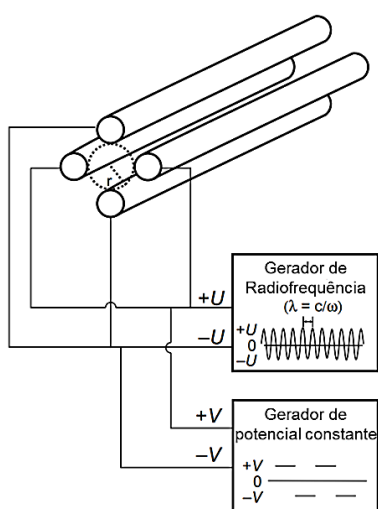


Figura 3.9 - Representação de um analisador do tipo quadroplo. O gerador de radiofrequência produz uma onda sinusoidal com amplitude, U , variável. O gerador de potencial constante produz uma voltagem, V , que altera apenas de sinal. Adaptado de (45).

- **Detetor de íões**

Após passarem pelo analisador de massas, os íões seguem para um detetor capaz de gerar uma corrente elétrica proporcional à sua abundância e possibilitar a sua quantificação.

Os íões são detetados com base na sua carga, massa e velocidade. Alguns detetores, como a caixa de Faraday, medem a corrente de carga direta que é produzida quando um ião colide com uma superfície e é neutralizado. Outros, como os multiplicadores de eletrões, medem a transferência de energia cinética de íões incidentes que, após colidirem com uma superfície, criam eletrões secundários, que são amplificados para gerarem uma corrente elétrica.

As correntes de íões que saem do analisador são de intensidades muito pequenas, o que implica que a maior parte destes íões nunca chega ao detetor, porque o analisador só permite a passagem de um valor de m/z de cada vez. Esta perda de sensibilidade pode ser restaurada ao amplificar o sinal utilizando um multiplicador de íões.

Neste detetor, os íões provenientes do analisador são acelerados até uma velocidade suficientemente elevada, dependendo da voltagem aplicada, para aumentar a eficiência de deteção. Existem dois tipos de multiplicadores de eletrões: o discreto e o contínuo, distinguidos esquematicamente na figura 3.10.

O primeiro multiplicador é constituído por 12 a 20 dínodos em série, ligados entre si, com potenciais consecutivamente mais negativos. Os íões vão colidindo sucessivamente em cada dínodo e acelerando de modo a multiplicar o sinal até um nível de deteção adequado.

Os multiplicadores contínuos têm a forma de um canal constituído por dínodos, ligados entre si e com um potencial uniforme. Uma voltagem aplicada entre as duas extremidades do canal produz um campo de aceleração de partículas contínuo ao longo do canal, aumentando o número de colisões entre os íões e os dínodos, amplificando assim o sinal (34,45,46).

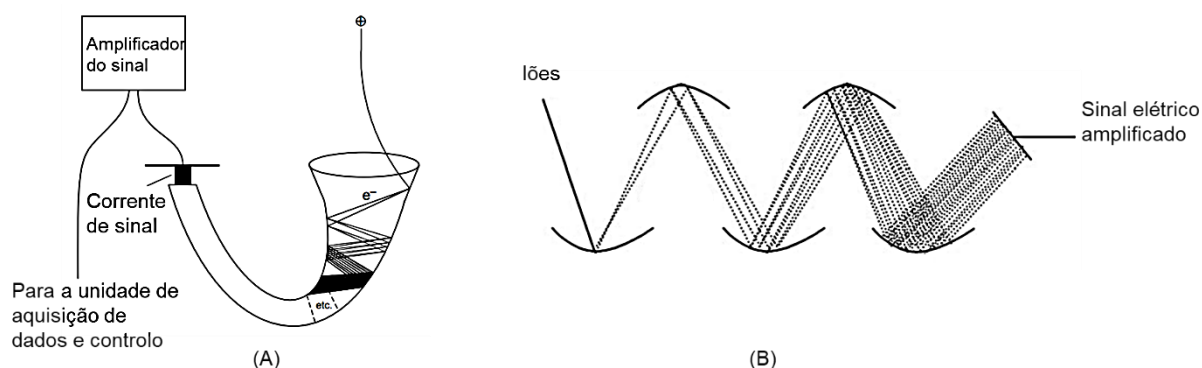


Figura 3.10 - Representação esquemática de um multiplicador de eletrões: A - multiplicador contínuo; B - multiplicador discreto. Adaptado de (45,46).

3.3. Cromatografia gasosa / espetrometria de massa

Como já foi referido anteriormente, a cromatografia gasosa é uma técnica de separação que tem a capacidade de conseguir separar misturas muito complexas. No entanto, uma vez separados, detetados e quantificados, o único dado disposto para a identificação de cada composto individual de uma amostra alvo é o respetivo tempo de retenção do pico cromatográfico correspondente. Este dado não é suficiente para uma identificação irrefutável, sobretudo quando se analisam amostras com um número elevado de compostos, como é frequente em colunas capilares.

Por outro lado, a espetrometria de massas permite identificar de maneira quase inequívoca qualquer substância pura, mas normalmente não é capaz de identificar os compostos individuais de uma mistura sem haver separação prévia destes, devido à extrema complexidade do espetro obtido por sobreposição dos espetros particulares de cada composto.

Deste modo, a associação destas duas técnicas dá lugar a uma técnica combinada, cromatografia gasosa acoplada com espetrometria de massa, GC/MS, que permite a separação e identificação de misturas complexas.

Na figura 3.11 encontra-se representado um sistema típico da técnica de GC/MS, onde uma mistura de compostos é injetada no cromatógrafo gasoso, vaporizada e separada na coluna cromatográfica, obtendo a eluição sucessiva dos compostos individuais isolados que passam imediatamente para o espetrómetro de massas. Cada um dos compostos é registado em forma de pico cromatográfico e identificado mediante o respetivo espetro de massas (17,47).

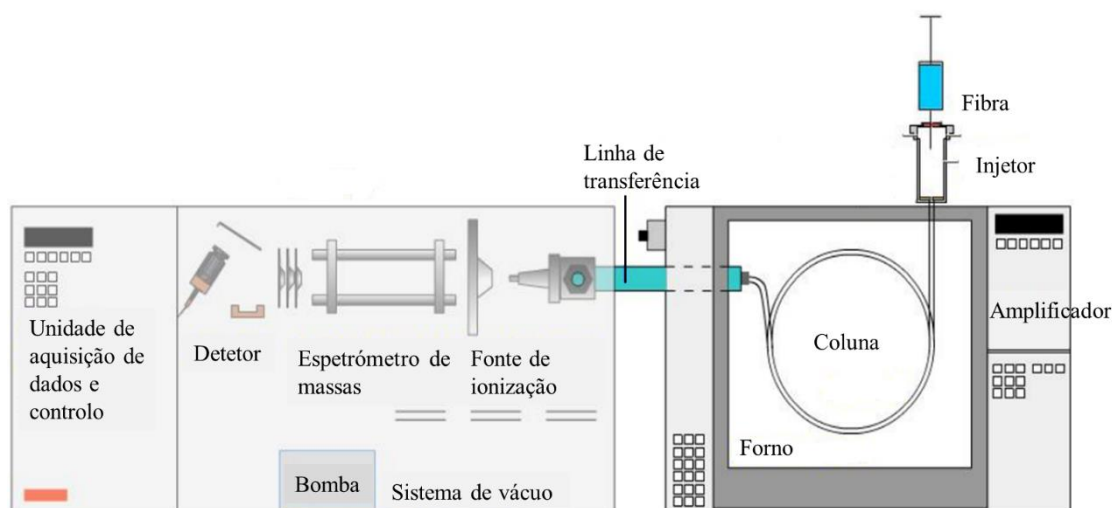


Figura 3.11 - Esquema típico de um sistema de GC/MS. Adaptado de (48).

4. Validação de métodos de ensaio

4.1. Introdução

Cada vez mais é exigida e reconhecida a necessidade de evidenciar a qualidade de um método de ensaio analítico, embora este possa envolver a presença de possíveis erros e, conseqüentemente, a eventual alteração significativa dos resultados.

Para controlo efetivo dos resultados e para a garantia da interpretação e confiabilidade dos mesmos, o método analítico é sujeito a uma série de etapas de avaliação, que garantem a sua validação. De acordo com a norma ISO/IEC 17025, um método deve ser validado quando é necessário demonstrar que as características do seu desempenho são adequadas para uma aplicação específica.

A validação deve ser feita para métodos não normalizados, métodos desenvolvidos internamente pelo laboratório, métodos normalizados utilizados fora do seu âmbito de utilização ou extensões, ou modificações de métodos normalizados, para confirmar se o método é adequado à utilização prevista.

Independentemente do tipo de método a ser validado, os requisitos mínimos para a sua validação são a seletividade, a precisão, a linearidade e gama de trabalho, os limites de deteção e quantificação, a sensibilidade e a exatidão.

O processo de validação do método pode ser dividido de acordo com dois tipos de avaliação, direta e indireta, o qual deve ser sempre sujeito a um controlo químico da qualidade e, sempre que seja possível, deve ser determinada a estimativa da incerteza associada a um resultado obtido (49–51).

4.2. Avaliação indireta

4.2.1. Seletividade

A seletividade de um método analítico refere-se à habilidade de um método detetar e analisar analitos específicos em misturas ou matrizes sem interferência de outros componentes com comportamentos semelhantes, como metabolitos, impurezas, produtos de degradação ou componentes da matriz.

Este parâmetro é normalmente instigado pela sua capacidade de detetar o analito de interesse em amostras nas quais foram deliberadamente introduzidos contaminantes específicos. Na eventualidade da interferência destes contaminantes na deteção e identificação dos analitos de interesse, o método deve ser devidamente retificado (49,52).

4.2.2. Precisão

A precisão avalia o grau de concordância entre os resultados obtidos em ensaios independentes quando um método analítico é usado repetidamente sobre preferencialmente uma mesma amostra, de modo a minimizar os efeitos da matriz, mas também sobre amostras semelhantes ou padrões.

A precisão do método varia geralmente com a gama de concentrações e pode ser determinada de três formas: pela repetibilidade, pela reprodutibilidade e/ou pela precisão intermédia (53).

- **Repetibilidade**

A repetibilidade expressa a precisão de um método efetuada nas mesmas condições de operação, como mesmo Laboratório, mesmo analista, mesmo equipamento, mesmo material e reagentes, num curto intervalo de tempo.

O limite de repetibilidade, r , é o limite abaixo do qual se deve dispor, para um nível de confiança de 95%, a diferença absoluta entre os resultados de dois ensaios de padrões de controlo efetuados em condições de repetibilidade, X_i e X_{i-1} , e pode ser calculado pela equação 4.1.

$$r = 2,8 \times S_r \quad (4.1)$$

Onde,

S_r é o desvio padrão da repetibilidade para um nível de confiança de 95%.

Na prática, os valores de X_i e X_{i-1} serão aceites apenas se $|X_i - X_{i-1}| \leq r$. No entanto, se a amplitude entre os dois ensaios for superior ao limite dever-se-á proceder a uma análise crítica e, no caso de ser necessário, repetir os ensaios segundo um método acordado em dados bibliográficos ou segundo as Normas ISO 5725-2 e ISO 5725-6 (53).

- **Reprodutibilidade**

A reprodutibilidade refere-se à precisão de um método realizado sobre uma mesma amostra, mas variando certas condições de ensaio, como diferentes Laboratórios, operadores, equipamentos e/ou dias. O objetivo deste parâmetro é verificar se o método em estudo providencia os mesmos resultados em condições diferentes.

Semelhante à repetibilidade, o limite de reprodutibilidade, R_r , é o limite abaixo do qual se deve dispor, para um nível de confiança de 95%, a diferença absoluta entre os resultados de dois ensaios de padrões de controlo efetuados nas condições referidas, e pode ser expresso pela seguinte equação (53,54).

$$R_r = 2,8 \times S_R \quad (4.2)$$

Onde,

S_R é o desvio padrão da reprodutibilidade para um nível de confiança de 95%.

- **Precisão intermédia**

A repetibilidade e a reprodutibilidade representam os extremos da variabilidade de um método de ensaio, sendo que a primeira apresenta uma variabilidade mínima e a segunda uma variabilidade máxima dos resultados. De forma a se obter uma precisão mais representativa da variabilidade dos resultados num laboratório, usa-se a precisão intermédia.

A precisão intermédia refere-se à precisão calculada a partir da mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, para um mesmo método, mas predefinindo condições específicas a variar, como diferentes analistas, equipamentos ou dias (53).

4.2.3. Quantificação

É imperativo definir as retas de calibração e calcular os limiares analíticos e a sensibilidade do método de ensaio, se se pretende interpretar os dados obtidos experimentalmente.

4.2.3.1. Curvas de calibração

A quantificação num método analítico requer o conhecimento sobre a dependência entre a resposta do sistema de medição e a concentração ou quantidade de analito. Esta relação é conseguida através da calibração, que pode originar tanto uma reta como uma curva e que deve ser efetuada aquando da análise e cumprindo os critérios de aceitação definidos internamente.

A reta ou curva de calibração é estabelecida pela preparação de soluções padrão de concentrações conhecidas, dentro da gama de trabalho, e interpolando os resultados obtidos até se obter o gráfico de calibração. Este gráfico corresponde ao sinal do equipamento em função da concentração e permite determinar concentrações desconhecidas em rotina.

Para realizar regressões lineares pelo método dos mínimos quadrados (Anexo B), é aconselhável o uso da norma ISO 8466-1 como referência para calibrações analíticas.

De modo a avaliar a obrigatoriedade da elaboração de uma reta de calibração em cada sequência de análises, podem ser realizados os testes de *Rikilt* (Anexo D) e das áreas normalizadas (Anexo E) (53).

- **Linearidade**

A linearidade de um método analítico é a sua habilidade, dentro de uma certa gama de concentrações, de obter respostas que são diretamente proporcionais à concentração de analito na amostra ou proporcionais por meio de um cálculo matemático.

Um modo de avaliar a linearidade da função de calibração analítica é pela análise da correlação linear, na qual o coeficiente de correlação, R (explicado com maior detalhe no Anexo B), deve ter normalmente um valor superior a 0,995 (limite teórico imposto para métodos analíticos sem derivatização).

De acordo com a norma ISO 8466-1, pode-se provar a linearidade com base num modelo estatístico, o teste de *Mandel* (Anexo C). No entanto, este teste poderá apenas ser aplicado no caso de haver homogeneidade de variâncias na gama de trabalho (Anexo F). É possível ainda utilizar o teste de *Rikilt* (Anexo D) para analisar a linearidade de cada ponto na reta de calibração (54,55).

- **Gama de trabalho**

Num procedimento analítico, o intervalo entre as concentrações máxima e mínima, incluindo as mesmas, de um analito na amostra para o qual foi demonstrado precisão, exatidão, linearidade e incertezas adequadas denomina-se gama de trabalho. A concentração mínima da gama de trabalho é delimitada pelo limite de quantificação, LOQ, enquanto a concentração máxima é definida pelas concentrações a partir das quais se observam anomalias significativas na sensibilidade.

No caso de se usar uma metodologia que envolve curvas de calibração, pode-se recorrer ao teste de homogeneidade de variâncias (Anexo F) para avaliar a gama de trabalho. No caso de a curva de calibração ser linear recomenda-se o uso da norma 8466-1, e da norma 8466-2 no caso de se tratar de um polinómio de 2.º grau (52,53).

4.2.3.2. Limiares analíticos

- **Limite de detecção (LOD)**

O limite de detecção, LOD, é a menor concentração de analito que pode ser detetada na amostra, mas não necessariamente quantificada.

Quantitativamente, o LOD é obtido por diversas metodologias (54,55):

- ❖ **Avaliação visual**

Na avaliação visual do limite de detecção, analisam-se amostras com concentrações conhecidas do analito e estabelece-se o valor mínimo para o qual se pode detetar o analito com confiança.

- ❖ **Desvio padrão residual da curva de calibração**

Para métodos que utilizem a reta de calibração para quantificação de analitos, o LOD pode ser calculado através da equação 4.3.

$$LOD = \frac{3,3 \times S_{y/x}}{m} \quad (4.3)$$

Onde,

$S_{y/x}$ é o desvio padrão residual da reta de calibração;

m é o declive da reta de calibração.

- ❖ **Análise de brancos de matriz fortificados**

O limite de detecção pode ser calculado pela equação 4.4, através da análise de um número apropriado de brancos fortificados com a concentração mais baixa da gama de trabalho.

$$LOD = 3 \times S_{x0} \quad (4.4)$$

Onde,

S_{x0} é o desvio padrão associado a várias leituras de padrão com a concentração mais baixa da gama de trabalho, normalmente com uma concentração vestigial.

- ❖ **Análise da razão sinal ruído**

O limite de detecção pode ainda ser determinado pela quantidade de analito injetado que resulta num pico cromatográfico com o sinal três vezes mais alto que o ruído da linha de base, isto é, com uma razão

sinal/ruído de 3:1. O LOD pode também ser calculado em função do limite de quantificação, através da equação 4.5.

$$LOD = \frac{LOQ}{3} \quad (4.5)$$

- **Limite de quantificação (LOQ)**

Define-se como limite de quantificação, LOQ, a concentração mínima de analito numa amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão adequadas. Este é um parâmetro de ensaios quantitativos para pequenas quantidades de compostos em matrizes.

Tal como para o limite de deteção, o LOQ pode ser determinado pela análise de amostras com concentrações conhecidas de analito e estabelecendo o limite mínimo no qual o analito pode ser quantificado adequadamente.

O LOQ pode ser calculado pelas mesmas metodologias do LOD, modificando apenas as fórmulas de cálculo.

- ❖ **Desvio padrão residual da curva de calibração**

Se o método analítico envolver a utilização da reta de calibração, o LOQ pode ser calculado pela equação 4.6.

$$LOQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{m} \quad (4.6)$$

Onde,

$S_{y/x}$ é o desvio padrão residual da reta de calibração;

m é o declive da reta de calibração.

- ❖ **Análise de brancos de matriz fortificados**

O limite de quantificação pode ser calculado através da equação 4.7.

$$LOQ = 10 \times S_{x0} \quad (4.7)$$

Onde,

S_{x0} é o desvio padrão associado a várias leituras de padrão com a concentração mais baixa da gama de trabalho, normalmente com uma concentração vestigial.

❖ **Análise da razão sinal/ruído**

O limite de quantificação pode ainda ser determinado quantitativamente pela razão sinal/ ruído (equação 4.8), usando um fator de 10 e convertendo esse valor em concentração.

$$LOQ = \frac{C_P \times 10}{S/N} \quad (4.8)$$

Onde,

C_P é a concentração do padrão;

S/N é a razão sinal/ruído.

De notar que a determinação dos limiares analíticos pela razão sinal/ruído apresenta limitações devido à sua dependência à região do cromatograma a analisar, tornando-se subjetiva, e devido à inviabilidade na determinação do limite de deteção, onde por vezes não é possível visualizar o pico de interesse em concentrações vestigiais (54–56).

4.2.3.3. Sensibilidade

Entende-se por sensibilidade de um método analítico, S , a capacidade do mesmo de discriminar pequenas diferenças na concentração ou massa do analito em estudo.

Na prática, se a curva de calibração for linear, a sensibilidade corresponderá ao declive da mesma, sendo constante ao longo de toda a gama de trabalho e podendo ser representada matematicamente da seguinte forma.

$$S = \frac{\Delta L}{\Delta C} \quad (4.9)$$

Onde,

ΔL é a variação do sinal analítico obtido;

ΔC é a variação da concentração que está associada à variação do sinal de resposta.

Pela equação 4.9, pode-se considerar que um método é sensível quando pequenas variações na concentração geram grandes alterações no sinal analítico obtido (53,54).

4.3. Avaliação direta

A avaliação direta pretende conhecer a exatidão dos métodos de ensaio, isto é, analisar a concordância entre o resultado fornecido pelo método de análise e o valor de referência aceite como verdadeiro. A exatidão é, então, um indicador dos erros sistemáticos do método.

Neste tipo de análise, podem ser utilizados vários processos, nomeadamente, materiais de referência certificados, ensaios interlaboratoriais e ensaios de recuperação (53).

4.3.1. Materiais de referência certificados, MRC

Os materiais de referência certificados, MRC, apresentam um valor de concentração conhecida para cada parâmetro de interesse, com uma incerteza associada a esse valor.

A aquisição de um MRC é essencial para a avaliação do desempenho de um laboratório, através da comparação do valor obtido pelo método na análise de um MRC com o valor certificado, por uma entidade reconhecida e credível. Quando o valor obtido na análise do MRC não se encontra dentro do intervalo de incerteza indicado para o valor certificado, o laboratório deverá elaborar um plano de ação de forma a procurar as causas na origem desse desvio e tentar eliminá-las ou aceitá-las.

A avaliação dos resultados obtidos na análise de um MRC pode ser feita usando processos auxiliares, tais como o cálculo do erro relativo, teste de hipóteses (*t-test*), fator de desempenho Z (*z-score*) e do erro normalizado (53).

4.3.2. Ensaaios interlaboratoriais

Com o intuito de estabelecer a comparação entre os resultados obtidos pelo laboratório e o valor aceite como verdadeiro, recorre-se à utilização de ensaios interlaboratoriais. Estes são uma ferramenta fundamental, visto dependerem da colaboração entre instituições laboratoriais para assegurarem a qualidade do resultado obtido pelo método e aferirem a fiabilidade do método implementado.

Os ensaios interlaboratoriais podem ser distribuídos em cinco tipos distintos, mediante os objetivos a que se destinam.

- ❖ Ensaio de aptidão ou competência – visa avaliar o desempenho do analista ou dos laboratórios participantes. Os participantes, geralmente, têm liberdade de escolha do método de análise.

- ❖ Ensaio colaborativo – visa o estudo das características de um procedimento analítico (reprodutibilidade e repetibilidade). É exigido a utilização exclusiva do método para os laboratórios participantes.
- ❖ Ensaio comparativo – visa a comparação dos resultados obtidos por diferentes métodos analíticos. Os vários métodos diferem entre os laboratórios participantes com base nas capacidades de cada um.
- ❖ Ensaio de consenso ou de conformidade – visa o estudo das propriedades de um ou mais materiais, servindo de base para futuros estudos interlaboratoriais ou controlos de qualidade.
- ❖ Ensaio de certificação – visa a determinação de valores certificados de um material candidato a MRC e respetivas incertezas ao analisar o material usando o(s) método(s) mais adequado(s).

A utilização do fator de desempenho Z (z -score) permite avaliar o desempenho obtido por um laboratório, ao comparar os seus resultados com o resultado aceite como verdadeiro e obtendo uma escala de discordância entre os dois (57).

4.3.3. Ensaio de recuperação

No caso de não existirem ensaios interlaboratoriais nem materiais de referência certificados aptos para o composto em estudo, usam-se ensaios de recuperação para avaliar a exatidão do método. Estes são muito importantes na análise quantitativa da resposta analítica obtida em inúmeras matrizes, devendo ser efetuados regularmente e ao longo de toda a gama de trabalho.

Depois do analito ser extraído da matriz e ser injetado no instrumento analítico, a sua recuperação pode ser determinada ao comparar a quantidade de analito recuperada no processo com a quantidade real presente na amostra. Esta comparação visa avaliar o efeito da matriz ao verificar a presença de interferentes característicos de determinadas matrizes, que causam o aumento ou diminuição da resposta analítica. A percentagem de recuperação é dada pela equação 4.10.

$$\%recuperação = \frac{C_e}{C_t} \times 100 \quad (4.10)$$

Onde,

C_e é a concentração do composto na amostra fortificada obtida experimentalmente;

C_t é a concentração teórica do composto na amostra fortificada.

Em termos de critérios de aceitação, a recuperação apresenta-se, por exemplo, entre 80-120%, no entanto, cada laboratório tem a liberdade de definir outro critério, consoante o desempenho e/ou

complexidade do método. É de notar que o desvio padrão relativo, RSD, dos ensaios efetuados a cada matriz não deve ser superior a 25% (54,55,58).

4.4. Estimativa das incertezas

Para demonstrar a fiabilidade de um método analítico e o cumprimento dos seus objetivos, a validação do mesmo passa sempre pela avaliação da incerteza global do método.

Geralmente, a incerteza de um método é determinada por duas metodologias distintas, sendo que cada laboratório pode escolher qual a metodologia a usar, desde que se prove a respetiva validade no método em estudo.

4.4.1. Metodologia *bottom-up*

Na determinação da incerteza do método recorrendo à metodologia “passo a passo” foram consideradas e quantificadas as seguintes fontes de incerteza (59):

- **Componente da incerteza associada à preparação de soluções**

A incerteza associada à preparação de soluções é calculada pela soma de vários fatores relacionados com as fontes primárias de incerteza, como a pesagem do padrão comercial, a medição do volume (balão volumétrico e seringa de vidro), pureza e massa volúmica do padrão.

$$u_{\text{padrão}} = C \times \sqrt{\left(\frac{u_{mv}}{mv}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_b}}{V_b}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_{sv}}}{V_{sv}}\right)^2 + \left(\frac{u_{pur}}{pur}\right)^2} \quad (4.11)$$

Onde,

C é a concentração da solução padrão primária, em m/v

u_{mv} é a incerteza padrão associada à massa volúmica do padrão comercial

mv é a massa volúmica do padrão comercial

u_{V_b} é a incerteza associada à medida do volume do balão volumétrico

V_b é o volume do balão volumétrico, em mL

$u_{V_{sv}}$ é a incerteza associada à medida do volume da seringa de vidro

V_{sv} é o volume da seringa de vidro, em mL

u_{pur} é a incerteza associada à pureza do padrão comercial

pur é a pureza do padrão comercial

- **Componente da incerteza associada à interpolação da curva de calibração**

A incerteza associada à interpolação da curva de calibração, vai ser calculada a partir da equação 4.11, desde que cumpra as normas ISO referentes ao método dos mínimos quadrados.

$$u_{reta} = \frac{S_{y/x}}{m} \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{y}_b - \bar{y})^2}{m^2 \sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (4.11)$$

Onde o desvio padrão residual, $S_{y/x}$, é dado pela seguinte equação.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - mx_i - b)^2}{N-2}} \quad (4.12)$$

- **Componente da incerteza associada à precisão intermédia**

A avaliação da incerteza associada à precisão é uma componente essencial no cálculo da incerteza global, pelo que precisa de ser avaliada, tendo em conta a variabilidade, dispersão e erros aleatórios que possam existir no decorrer do método analítico.

Para a avaliação da incerteza pode-se optar entre a precisão intermédia e a repetibilidade. Neste estudo, foi escolhida a precisão intermédia devido ao facto de conseguir refletir eventuais variações do método que possam ocorrer quando são efetuados em dias diferentes.

Como tal, a incerteza da precisão intermédia pode ser calculada com recurso a soluções padrão, pela seguinte equação.

$$u_{prec\ int} = \frac{S}{\bar{C} \times \sqrt{N}} \times 100 \quad (4.13)$$

Onde,

S é o desvio padrão associado à média dos ensaios efetuados;

\bar{C} é a concentração média do número de padrões analisados;

N é o número de padrões analisados.

- **Incerteza combinada**

Com base nas três componentes de incertezas associadas à primeira metodologia é possível calcular a incerteza combinada, através da equação 4.14.

$$u_c = \sqrt{u_{padr\tilde{a}o}^2 + u_{reta}^2 + u_{prec\ int}^2} \quad (4.14)$$

4.4.2. Metodologia *top-down*

A metodologia *top-down* consiste na incerteza combinada relativa às componentes de incerteza associada à precisão e à exatidão e pretende quantificar vastamente a incerteza associada ao ensaio.

- **Componente da incerteza associada à precisão**

A incerteza associada à precisão, em condições de precisão intermédia, pode ser estimada, tal como para a metodologia *bottom-up*, pela equação 4.13.

- **Componente da incerteza associada à exatidão**

A incerteza associada à exatidão é fundamentada pela fortificação de várias matrizes com uma concentração conhecida usadas nos ensaios de recuperação. Deste modo, cada matriz foi fortificada com uma concentração conhecida de analito e valor médio dos ensaios de recuperação, \bar{R}_m , obtido foi calculado pela equação 4.16.

$$\bar{R}_m = \frac{\bar{C}}{C_{spike}} \quad (4.16)$$

Onde,

\bar{C} é a concentração média obtida nos ensaios de recuperação efetuados;

C_{spike} é a concentração teórica da amostra fortificada.

Como a componente da incerteza associada à exatidão é calculada apenas com recurso a ensaios de recuperação, esta pode ser estimada a partir do *bias*. O *bias* consiste em duas componentes: a diferença entre uma recuperação a 100% e uma recuperação observada experimentalmente e a incerteza associada à amostra (60,61).

A componente da incerteza associada à exatidão pode ser calculada por duas formas: de acordo com a ISO 11352 e com o guia *Nordtest*.

❖ ISO 11352

De acordo com o ISO 11352, o *bias* pode ser calculado pela equação 4.17.

$$u_{bias} = \sqrt{b_{R_m}^2 + u_{fort.}^2} \quad (4.17)$$

Onde,

b_{R_m} é a raiz quadrada dos desvios associados aos ensaios de recuperação;

$u_{fort.}$ é a incerteza na concentração de analito adicionado.

A raiz quadrada dos desvios associados aos ensaios de recuperação, b_{Rm} , foi obtida pela equação 4.18.

$$b_{Rm} = \sqrt{\frac{\sum b_i^2}{n}} \quad (4.18)$$

Onde,

b_i é o desvio entre a recuperação de analito a 100% da amostra e a recuperação de analito obtida experimentalmente;

n é o número de ensaios de recuperação.

❖ Guia Nordtest

De acordo com o guia *Nordtest*, a incerteza associada à exatidão é calculada pela equação 4.19.

$$u_{\text{exatidão}} = u(\overline{R_m}) = \overline{R_m} \times \sqrt{\left(\frac{S_{\text{fort.}}^2}{n \times \bar{C}^2}\right) + \left(\frac{u(C_{\text{spike}})}{C_{\text{spike}}}\right)^2} \quad (4.19)$$

Onde,

$S_{\text{fort.}}$ é o desvio padrão de uma série de análises de amostras fortificadas;

$u(C_{\text{spike}})$ é a incerteza associada à fortificação da amostra.

• Incerteza combinada

De acordo com esta metodologia, a partir das incertezas calculadas nas equações 4.15 e 4.19, é possível determinar a incerteza combinada do método pela equação 4.20.

$$u_c(U) = \sqrt{(u_{\text{prec. int.}}^2 + u_{\text{exatidão}}^2)} \quad (4.20)$$

• Incerteza expandida

A incerteza global do método, normalmente expressa como incerteza expandida, é igual à incerteza combinada afetada por um coeficiente de expansão, k , que toma valores situados entre 2 e 3. Neste caso, calculou-se para um k de valor 2 com um nível de confiança de 95%, através da equação 4.21.

$$U(C) = 2 \times u_c(C) \quad (4.21)$$

A expressão dos resultados com a incerteza é expressa da seguinte forma.

$$C \pm U(C) \text{ [unidades de concentração]} \quad (4.22)$$

É recomendado, pela IUPAC, que a incerteza seja apresentada com um máximo de dois algarismos significativos e que o número de algarismos do resultado do ensaio deve ser apresentado em função do número de algarismos significativos usado para a expressão da incerteza em termos absolutos (62).

5. Materiais e métodos

5.1. Equipamento e material

- ❖ Cromatógrafo gasoso *Agilent* 8890, com coluna cromatográfica JW/DB-VRX 60 m x 320 µm x 1,80 µm acoplado a um espectrômetro de massa *Agilent* 5977B;
- ❖ Fibras para SPME, *Supelco*:
 - *Grey* – DVB/CAR/PDMS 30/50 µm;
 - *Blue* – PDMS/DVB 65 µm;
 - *White* – PA 85 µm;
 - *Green* – PDMS 7 µm;
 - *Black* – CAR/PDMS 75 µm;
- ❖ *Software* de aquisição de dados, *ChemStation MSD*
- ❖ Sistema de água ultrapura, *Mili Q, Milipore*;
- ❖ Seringas de vidro de 10, 25, 50, 100 e 250 µL, *Agilent*;
- ❖ Pipetas graduadas de 2 e 5 mL, *Poulsen & Graf*
- ❖ Pipetas *Pasteur, Normax*;
- ❖ Balões de vidro de 5, 10 e 100 mL, *Hirschmann*;
- ❖ *Vials* de vidro de 20 mL, *Gerstel*;
- ❖ Cápsulas magnéticas com septo de borracha natural/PTFE para *vials* de 20 mL, *Gerstel*;
- ❖ Capsulador;
- ❖ Balança analítica, *Mettler Toledo XS 204*;
- ❖ Agitador *Vortex, Velp Scientifica*;
- ❖ Banho ultrassons, *VWR*;
- ❖ Métodos de aquisição no MS para o reagente de derivatização:
 - PFBHA;
- ❖ Métodos de aquisição no MS para o formaldeído:
 - ALD2021.

5.2. Reagentes

• Padrões certificados

- ❖ Formaldeído, 37% w/w estabilizado com 7-8% de metanol, HCHO, *Alfa Aesar*;

- **Reagente de derivatização**

- ❖ Hidrocloreto de o-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzil)hidroxilamina, 99%, $C_7H_4F_5NO.HCl$, *Alfa Aesar*.

- **Solventes**

- ❖ Água ultrapura;

- **Amostras**

- ❖ Água destinada ao consumo humano proveniente da rede de distribuição da EPAL;
- ❖ Água superficial da captação de Castelo de Bode (rio Zêzere);
- ❖ Água superficial da captação da Valada do Ribatejo (rio Tejo).
- ❖ Água subterrânea de uma captação na zona da Azambuja

5.3. Procedimento experimental

5.3.1. Preparação da solução do reagente de derivatização

Num balão volumétrico de 5 mL pesar cerca de 85 mg do reagente de derivatização (PFBHA). Adicionar água ultrapura até quase ao traço de aferição e agitar em banho de ultrassons até à completa dissolução do reagente. Completar o volume do balão volumétrico com água ultrapura e agitar a solução. A concentração desta solução de derivatização é de 17 mg/mL (27). Esta solução é transferida para um *vial* e é reutilizada até se deixar de produzir os resultados desejados, por volta de 120 injeções.

5.3.2. Preparação de soluções padrão

- **Solução padrão primária individual de formaldeído**

Medir rigorosamente cerca de 25 μ L do padrão comercial de formaldeído com uma seringa de vidro. Transfere-se quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL contendo água ultrapura. Completar o volume com água. Esta solução tem uma concentração aproximada de 100,18 mg/L, em água. Esta solução tem um prazo de validade de 1 dia.

- **Solução padrão intermédia de formaldeído**

Transfere-se com uma seringa de vidro 50 μ L da solução primária de formaldeído, para um balão volumétrico de 10 mL contendo água ultrapura. Completar o volume com água. Esta solução tem uma concentração aproximada de 0,5 mg/L. Esta solução tem um prazo de validade de 1 dia.

- **Solução padrão de trabalho**

Para a preparação dos padrões de calibração P1 a P5, transfere-se com uma seringa de vidro o volume adequado da solução padrão intermédia de formaldeído, indicados na tabela 5.1, para um *vial* de vidro contendo 10 mL de água ultrapura. Estas soluções são preparadas na altura da análise. Estas soluções têm validade de 1 dia.

Para a preparação dos padrões de calibração P6 e P7, transfere-se com uma seringa de vidro o volume adequado da solução padrão primária de formaldeído, indicados na tabela 5.1, para um *vial* de vidro contendo 10 mL de água ultrapura. Estas soluções são preparadas na altura da análise. Estas soluções têm validade de 1 dia.

Tabela 5.1 – Preparação das soluções de calibração usadas.

Padrões	Volume adicionado ao <i>vial</i> (µL)	Concentração formaldeído (µg/L)
P1	10	0,5
P2	200	10
P3	500	25
P4	1000	50
P5	2000	100
P6	25	250
P7	50	500

5.3.3. Condições de SPME

Como foi referido no capítulo 2, a otimização da técnica de SPME recai sobre vários parâmetros, nomeadamente: o tipo de fibra a utilizar, o tempo e temperatura de adsorção, o tempo de desadsorção, a agitação e o modo de extração, cujas condições ótimas se encontram reunidas na tabela 5.2, juntamente com as condições usadas para o reagente de derivatização.

Tabela 5.2 - Condições ótimas de SPME obtidas para o formaldeído e condições usadas para o PFBHA. A percentagem de headspace corresponde ao volume vazio no vial.

Parâmetro	Condições formaldeído	Condições PFBHA
Pré-incubação (min)	15	4
Tipo de fibra	PDMS/DVB	PDMS/DVB
Tempo de adsorção (min)	30	4
Temperatura de adsorção (°C)	50	50
Tempo de desadsorção (min)	7	0
Agitação (rpm)	250	250
Modo de extração	50% <i>Headspace</i>	75% <i>Headspace</i>

5.3.4. Condições do método cromatográfico

Nas tabelas 5.3 a 5.10, encontram-se as condições relevantes ao método cromatográfico.

Tabela 5.3 - Condições do injetor.

Condições do injetor	
Temperatura (°C)	230
Modo de injeção	<i>Splitless</i>
Tempo de <i>splitless</i> (min)	1

Tabela 5.4 - Condições da coluna cromatográfica.

Condições da coluna	
Tipo de coluna	JW/DB-VRX 60 m x 320 µm x 1,80 µm
Modo de operação	Contínuo
Gás de arraste/fluxo (mL/min)	He/1,6

Tabela 5.5 - Condições operacionais do forno para o formaldeído.

Condições operacionais do forno – formaldeído		
Início	60°C	2 min <i>hold</i>
Rampa	5°C/min	220°C
Tempo total de análise		34,0 min

Tabela 5.6 - Condições operacionais do forno para o PFBHA.

Condições operacionais do forno – PFBHA		
Início		60°C
Rampa	30°C/min	250°C
Tempo total de análise		6,3 min

De notar que, devido a limitações do *software* do equipamento, foi necessário fazer uma corrida sem desadsorção para o reagente de derivatização.

Tabela 5.7 - Condições da interface.

Condições da interface	
Temperatura (°C)	250

Tabela 5.8 - Condições do detetor.

Condições do detetor	
Tipo de detetor	Espetrómetro de massa
Temperatura da fonte (°C)	230
Temperatura do quadrupolo (°C)	150
Tipo de ionização	EI
Energia de ionização (eV)	70

Tabela 5.9 - Modo de pesquisa do MS dos compostos em estudo.

Modo	Intervalo cromatográfico (min)	m/z
<i>Full scan</i>	3 – 34	50 – 400
SIM	3 – 34	161,0; 181,0; 182,0; 195,0

Tabela 5.10 – Representação do tempo de retenção e iões de quantificação do formaldeído e PFBHA escolhidos para o modo SIM.

Composto	t _R (min)	Iões de quantificação (m/z)
Formaldeído	22,738	161,0; 181,1; 182,1; 195,0
PFBHA	20,668	161,0; 181,1; 182,1; 195,0

6. Apresentação e discussão dos resultados obtidos

6.1. Identificação dos compostos em estudo

Numa primeira fase foi efetuada a análise de uma solução de trabalho de formaldeído após reação de derivatização. A análise foi efetuada por GC/MS em modo *full-scan*. A figura 6.1 representa o perfil de corrente iónica total e os respetivos picos relativos à abundância de todos os iões no detetor em função do tempo.

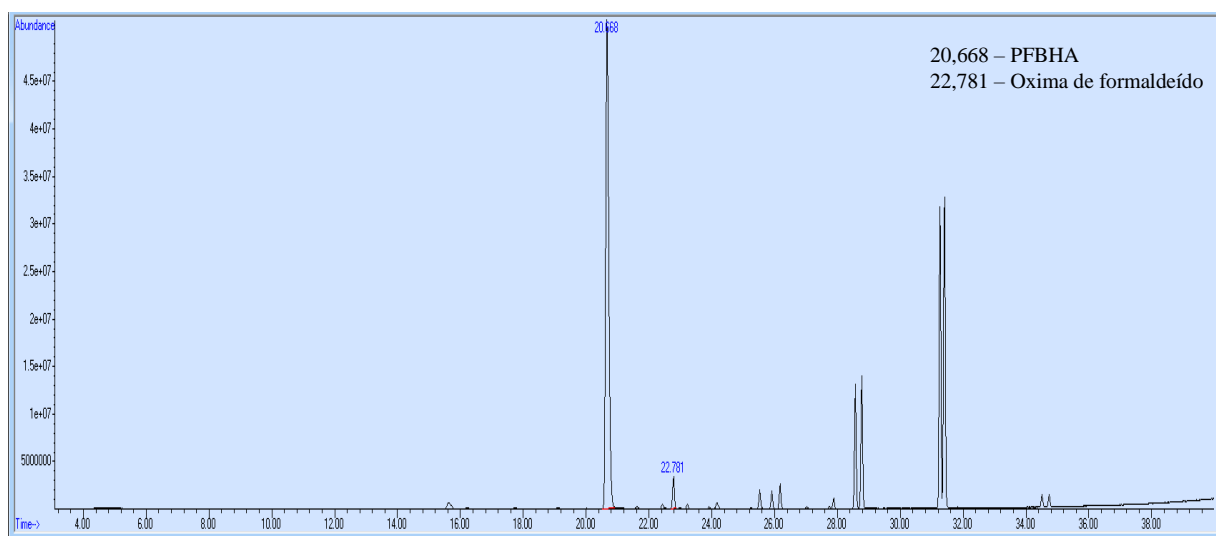


Figura 6.1 - Cromatograma da análise por Full scan.

Realizado a análise por *Full scan*, é possível determinar os iões de quantificação, que se encontram representados na tabela 5.10, do reagente de derivatização e da oxima de formaldeído de acordo com o espetro de massa obtido, representado nas figuras 6.2 e 6.3.

Na observação dos espetros de massa tanto da oxima de formaldeído como do reagente de derivatização, figuras 6.2 e 6.4 respetivamente, foram escolhidos como iões de quantificação os sinais de maior intensidade correspondentes às razões m/z 161, 181, 182 e 195.

Como a oxima e o reagente de derivatização produzem os mesmos iões de quantificação, com razões m/z iguais, é ainda necessário o auxílio do tempo de retenção de cada composto de modo a facilitar a sua distinção.

Estes dois compostos são hidrocarbonetos aromáticos e, como tal, os seus espetros de massa obtêm fragmentos com abundâncias elevadas, como é o caso do ião com razão m/z 181, por ser extremamente estável, dificultando futuras reações de fragmentação.

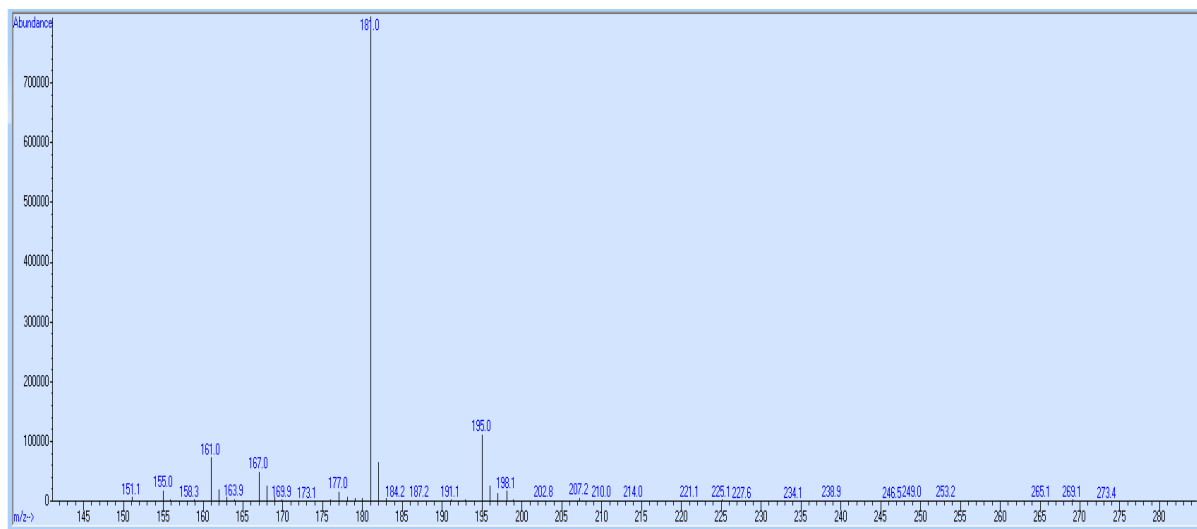


Figura 6.2 - Espectro de massa obtido para a oxima de formaldeído.

Com o auxílio do *software Mass Frontier* foi possível observar os mecanismos de fragmentação que podem explicar o aparecimento dos íons de quantificação selecionados.

Assim, a figura 6.3 apresenta um mecanismo possível de originar o íon de quantificação selecionado com m/z 181 da oxima de formaldeído.

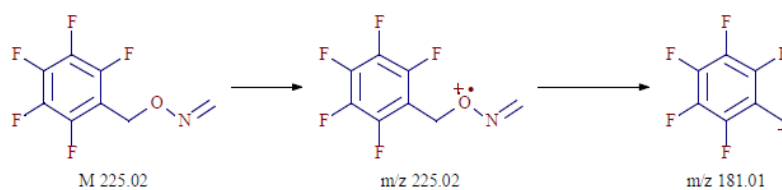


Figura 6.3 - Mecanismo possível de formação do íon característico m/z 181.

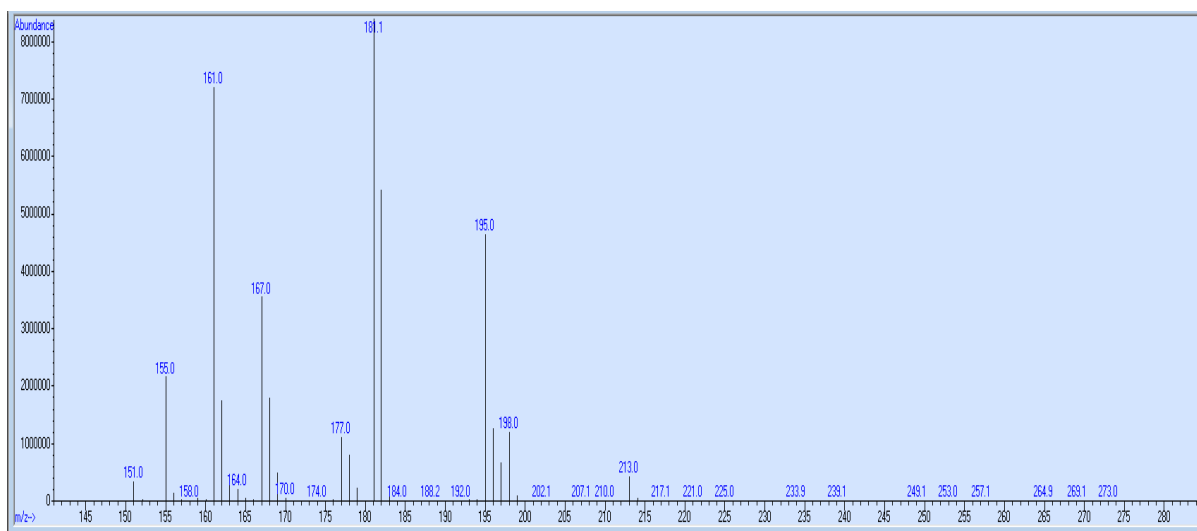


Figura 6.4 - espectro de massas obtido para o PFBHA.

No caso do PFBHA, as figuras 6.5 e 6.6 apresentam dois mecanismos possíveis de originar os íons de quantificação selecionados com m/z 181 e 195, sendo o último potencialmente derivado do íon com m/z 194.

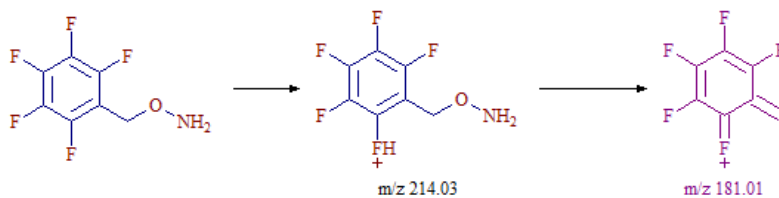


Figura 6.5 - Mecanismo possível de formação do íon característico m/z 181.

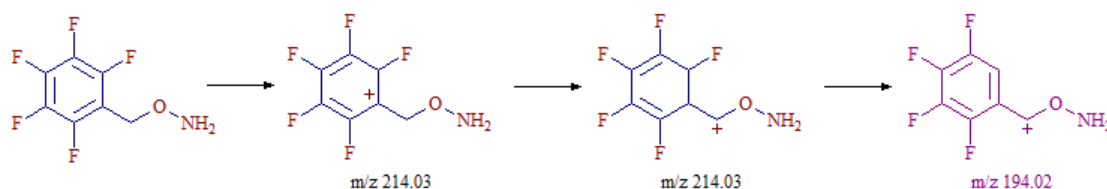


Figura 6.6 - Mecanismo possível de formação do íon característico m/z 194.

Recorrendo aos íons de quantificação selecionados, procedeu-se à análise, em modo SIM, do PFBHA e da oxima de formaldeído, resultando o perfil de corrente iônica extraída representado na figura 6.7.

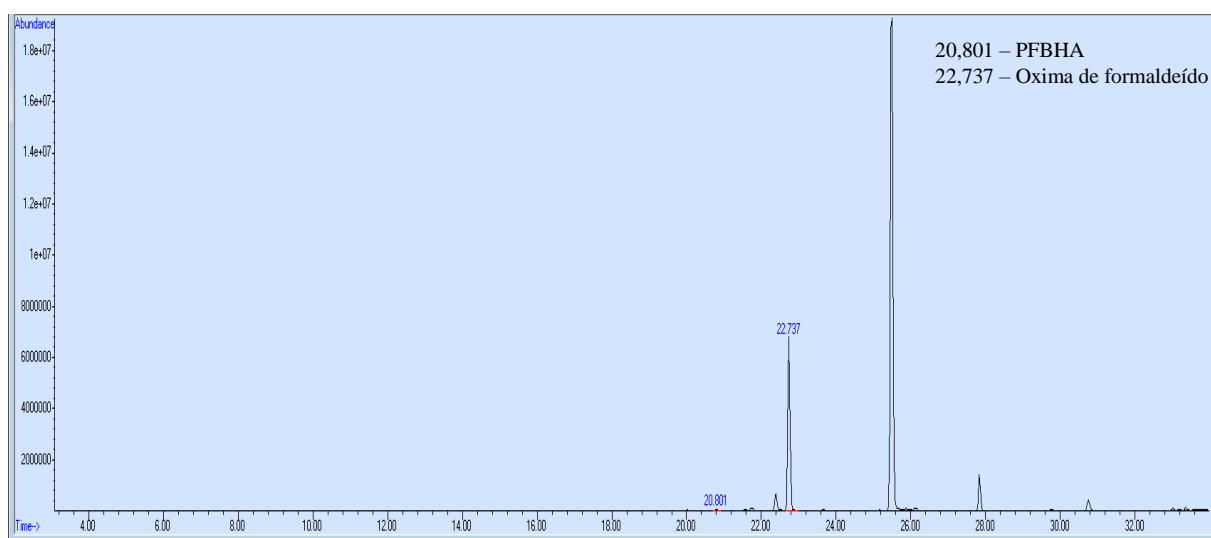


Figura 6.7 - Cromatograma da análise por SIM.

A acrescentar que a derivatização, para além de permitir analisar os compostos em estudo, tem ainda o benefício da obtenção de um espectro quase isento de interferências.

6.2. Otimização dos parâmetros do método de SPME

De modo a estudar as condições ótimas aquando da preparação da amostra, foram otimizados vários parâmetros do método de SPME, nomeadamente o tipo de fibra, tempo e temperatura de extração, tempo de desadsorção, aplicação ou não de agitação e modo de extração.

Esta otimização foi efetuada analisando o formaldeído após derivatização por GC/MS em modo SIM. A comparação das áreas dos picos cromatográficos obtidos para a oxima de formaldeído permitiu a escolha das condições ótimas dos parâmetros em estudo.

A avaliação de cada parâmetro foi feita mediante a análise de várias soluções com a mesma concentração de formaldeído, mantendo-se constantes todas as condições de ensaio e variando apenas o parâmetro a otimizar.

6.2.1. Tipo de fibra

Foram testadas várias fibras de SPME para estabelecer a que providencia a maior extração e estabilidade do reagente de derivatização e as características de retenção da oxima. As fibras utilizadas neste estudo foram as seguintes: DVB/CAR/PDMS 30/50 μm , PDMS/DVB 65 μm , PA 85 μm , PDMS 7 μm e CAR/PDMS 75 μm .

Num primeiro estudo, é necessário examinar a extração de PFBHA e o *carry-over* seguido de apenas um passo de desadsorção (28). Os ensaios efetuados no laboratório não permitiram tirar conclusões definitivas. Por este motivo, recorreremos aos estudos científicos apresentados na tabela 2.2, por outros autores. Da análise destes estudos, a fibra que extrai o PFBHA mais eficientemente e que tem menos *carry-over* para a amostra seguinte é a DVB/PDMS.

O próximo critério de seleção é a fibra que retém uma maior quantidade de PFBHA ao longo do tempo. Na tabela 2.2, segundo *Martos et al*, isso é conseguido ao carregar cada uma das fibras com PFBHA por um determinado tempo, expondo as fibras ao ar livre de formaldeído por 10 min e, em seguida, comparando a quantidade de PFBHA restante com a quantidade de PFBHA sem exposição ao ar.

Da comparação das fibras de SPME testadas no laboratório, observaram-se os resultados obtidos na figura 6.8.

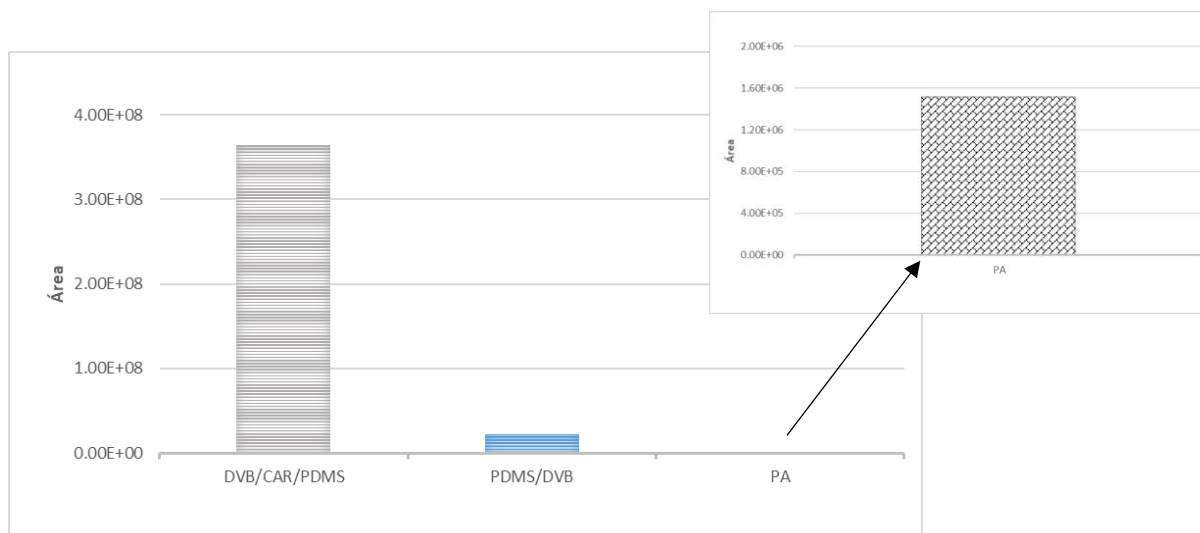


Figura 6.8 - Variação das áreas da oxima de formaldeído em função da fibra utilizada.

De notar que na figura 6.8 estão apenas representadas as fibras que demonstraram capacidade de potenciar a reação do PFBHA adsorvido com o formaldeído. A partir dos resultados obtidos, verifica-se que houve uma maior formação de oxima com a fibra DVB/CAR/PDMS.

Em cumulação de todos os resultados obtidos, concluiu-se que a fibra que torna a extração globalmente mais eficaz é a DVB/PDMS. A fibra DVB/PDMS é adequada para compostos voláteis com massa molecular entre 50 e 300 e extrai a oxima de pentafluorobenzilo por adsorção total devido à presença de microesferas porosas de DVB e imobilizadas na fibra de SPME contendo PDMS (18).

6.2.2. Tempo de extração

Na avaliação do tempo de adsorção, extraiu-se PFBHA para a fibra durante 4 minutos (27) e variou-se o tempo de extração de formaldeído para a fibra carregada com PFBHA entre os 5 e 35 minutos, com incrementos de cinco minutos. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 6.9.

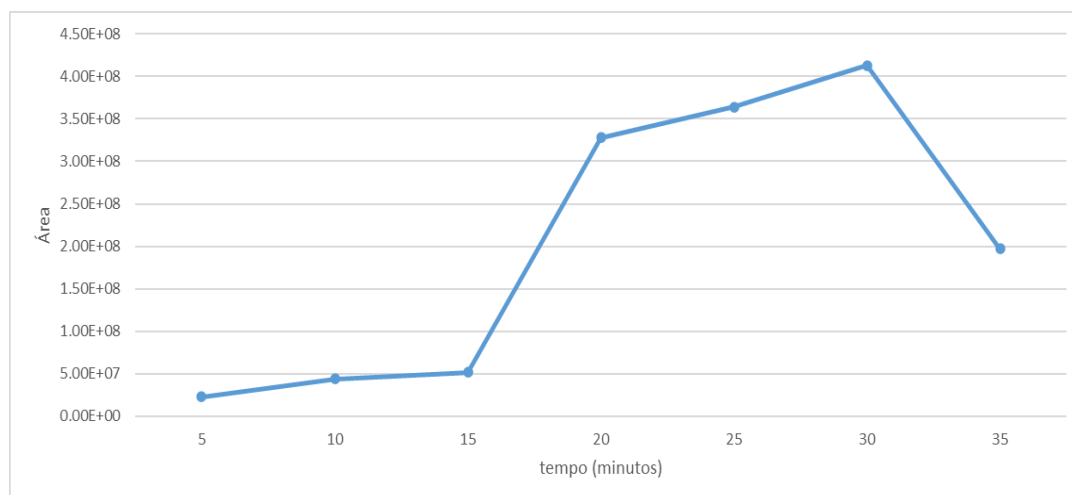


Figura 6.9 - Variação da área da oxima de formaldeído em função do tempo de extração.

Analisando a figura 6.9 conclui-se que o tempo de extração mais favorável para o estudo é de 30 minutos. De modo geral, a área cromatográfica do formaldeído mantém-se constante nos primeiros 15 minutos, aumentando gradualmente até aos 30 minutos e imediatamente seguida de um decréscimo das áreas.

No entanto, colocou-se a hipótese de que aos 30 minutos começa a haver reação inversa (passo D do subcapítulo 2.4), resultando na desadsorção do formaldeído por já não haver mais superfícies desocupadas na fibra. Escolhendo-se, assim, um tempo de extração de 25 minutos para evitar este problema.

6.2.3. Temperatura de extração

Na otimização da temperatura de extração variou-se apenas a temperatura do forno de SPME. Na figura 6.10 encontram-se os resultados das análises efetuados às seguintes temperaturas: 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60 °C.

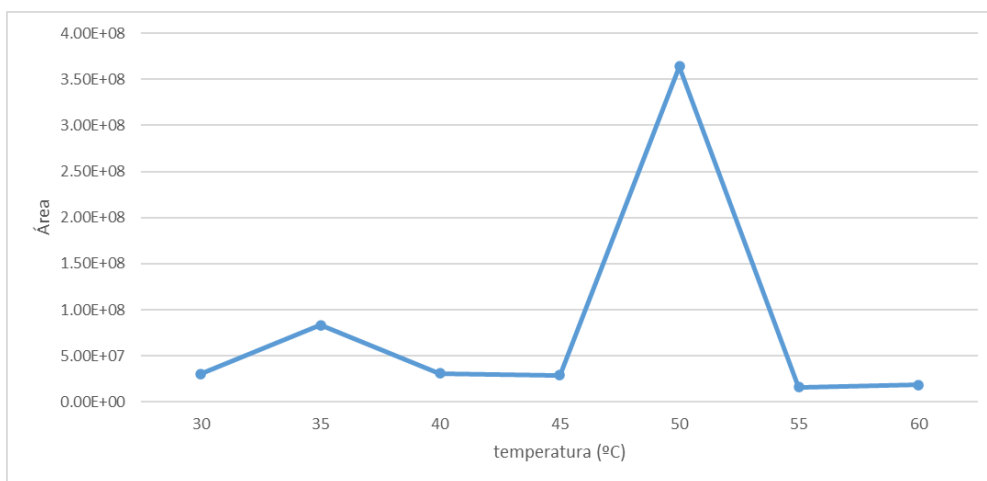


Figura 6.10 - Variação da área da oxima de formaldeído em função da temperatura de extração.

Pela análise da figura 6.10, verifica-se um aumento das áreas cromatográficas dos 30 aos 35 °C, seguido de uma diminuição das mesmas até aos 45 °C. As áreas voltam a aumentar até aos 50 °C, atingindo uma área máxima. Após este máximo, as áreas cromatográficas voltam a diminuir, possivelmente devido a fenómenos de desadsorção na fibra.

Assim, a temperatura de extração ideal, isto é, a correspondente a uma maior área obtida por parte do composto em estudo é 50 °C.

6.2.4. Tempo de desadsorção

Na otimização deste parâmetro, variou-se o tempo de desadsorção entre 1 e 8 minutos. Os resultados obtidos encontram-se na figura 6.11.

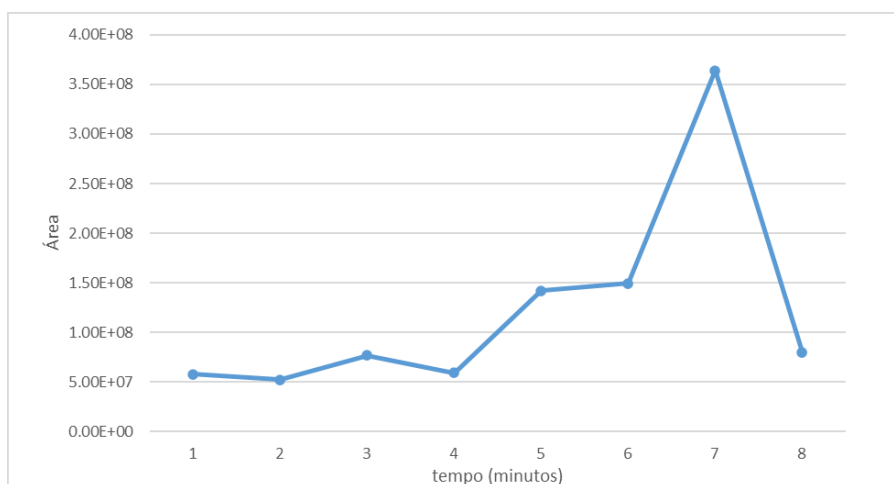


Figura 6.11 - Variação da área da oxima de formaldeído em função do tempo de desadsorção.

Analisando a figura 6.11, conclui-se que as áreas cromatográficas do formaldeído têm um valor máximo aos 7 minutos de desadsorção.

Um tempo de desadsorção de 7 minutos não só garante a desadsorção dos analitos de interesse, mas também minimiza a transferência de analitos que poderão interferir com a extração seguinte.

6.2.5. Agitação

O estudo da agitação foi efetuado de modo a perceber a sua importância na fase de pré-condicionamento do *vial* e de extração. De modo a preservar a integridade da fibra ao garantir o equilíbrio entre o aumento da eficiência da extração e a viabilidade do método, testou-se no máximo uma agitação de 500 rpm. Na figura 6.12 podem-se observar os resultados obtidos.

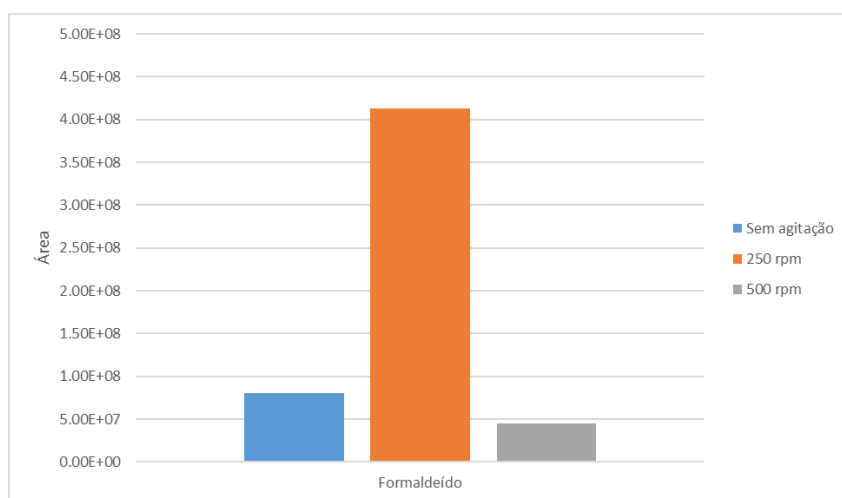


Figura 6.12 - Variação da área da oxima de formaldeído em função da agitação utilizada.

Pela análise da figura 6.12, verifica-se que uma agitação de 250 rpm aumenta a eficiência da extração do formaldeído sem danificar a fibra no processo.

6.2.6. Modo de extração

A avaliação do modo de extração incide sobre a influência de realizar a extração por *headspace* ou por imersão direta. No entanto, devido a possíveis fenómenos de hidrólise nos derivados da reação, que levam à diminuição do rendimento da mesma, realizou-se o estudo do modo de extração apenas por *headspace*.

Desta forma, variou-se unicamente a percentagem de *headspace*, a 25%, 50% e 75% do volume de *headspace*, correspondendo a 15 mL, 10 mL e 5 mL de solução no *vial*, respetivamente. Os resultados obtidos encontram-se na figura 6.13.

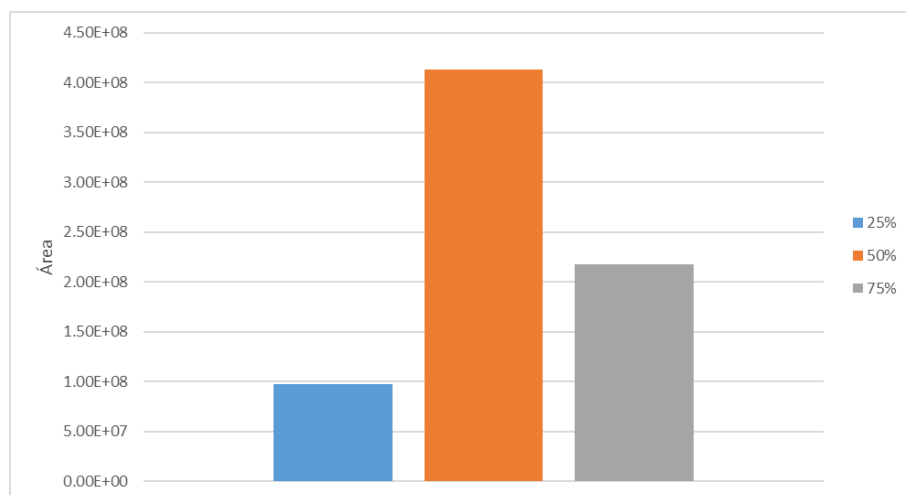


Figura 6.13 - Variação da área da oxima de formaldeído em função do volume de *headspace*.

Da análise da figura 6.13 verifica-se que 50% de *headspace* é ideal para obtenção de uma maior sensibilidade na extração do formaldeído.

6.3. Otimização e validação do método cromatográfico

Para além dos parâmetros de SPME, foi ainda considerado necessário otimizar um parâmetro do método cromatográfico, o tempo de *split/splitless*.

6.3.1. Tempo de *split/splitless*

Como referenciado no capítulo 3, o injetor pode trabalhar em modo *split*, no qual a válvula de *split* se encontra aberta e só uma pequena quantidade de amostra segue para a coluna, ou no modo *splitless*, em que a válvula permanece fechada antes e no momento da injeção, abrindo-se apenas após a mesma de modo a ventilar a câmara do injetor e levar consigo resíduos de amostra ainda presentes, impedindo-os de alcançar a coluna.

Num primeiro passo, foi comparada a análise por injeção no GC em modo *splitless* de 1 minuto e no modo *split* com uma razão 25:1. O modo *splitless* produziu maiores áreas cromatográficas que o modo *split*, como é possível verificar na figura 6.14.

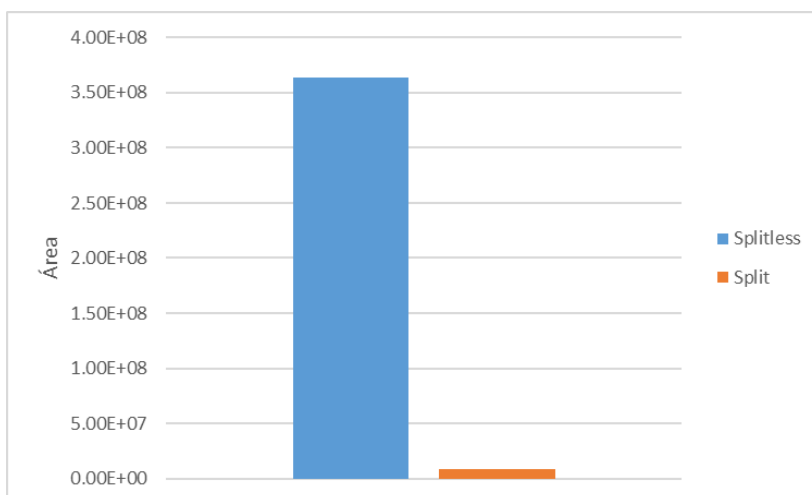


Figura 6.14 - Variação da área da oxima de formaldeído em função do modo splitless e split.

Na otimização do tempo de *splitless*, foram analisados tempos de *splitless* entre 1 e 5 minutos. Os resultados obtidos encontram-se na figura 6.15.

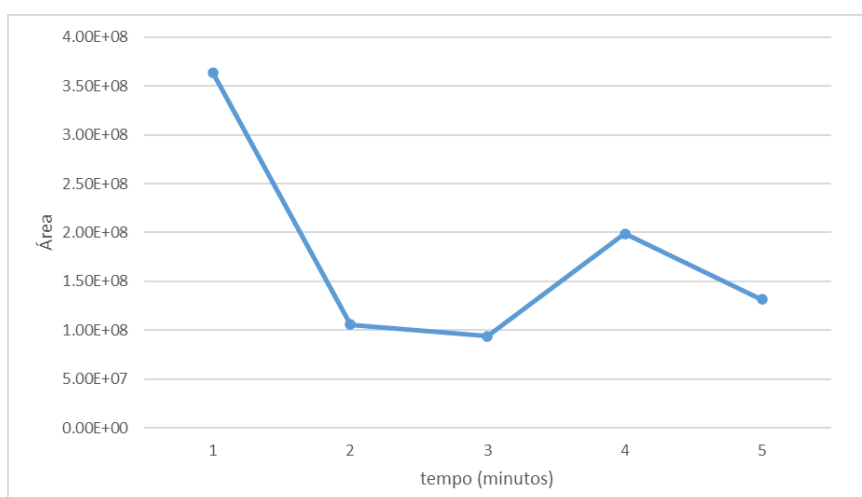


Figura 6.15 - Variação da área da oxima de formaldeído em função do tempo de splitless.

Da figura 6.15 observa-se que o tempo de splitless ideal é 1 minuto, visto ser o que produz uma maior área cromatográfica do composto em estudo.

Após concluída a otimização da preparação da amostra por SPME e do método cromatográfico, procedeu-se à validação do método cromatográfico de modo a permitir a sua implementação em futuras análises.

6.3.2. Estabilidade das soluções padrão

Os reagentes, solventes e soluções usados no controlo da curva de calibração devem apresentar um grau de pureza e estabilidade compatíveis com a qualidade exigida pelos resultados, independentemente da sua preparação ser feita pelo próprio laboratório ou adquirida comercialmente.

Deste modo, para a análise da estabilidade das soluções padrão foi preparada uma solução padrão de formaldeído com concentração referente ao P1 (tabela 5.1) e, essa mesma solução, foi analisada no próprio dia, no dia seguinte e cinco dias depois, sendo que parte da solução foi refrigerada e o restante foi mantido à temperatura ambiente.

A figura 6.16 apresenta a variação do sinal cromatográfico do formaldeído derivatizado após a análise destas soluções ao longo dos dias. O gráfico compara também a estabilidade da solução de formaldeído armazenada à temperatura ambiente e no frigorífico a uma temperatura de cerca de 5 °C. De notar que os resultados do dia 0 são os mesmos.

Para as soluções serem consideradas estáveis, a área cromatográfica do composto em estudo teria de ser semelhante em todos os dias analisados. Pela análise da figura 6.16, como tal não acontece conclui-se que as soluções não são estáveis e será necessário preparar novas soluções antes de cada análise.

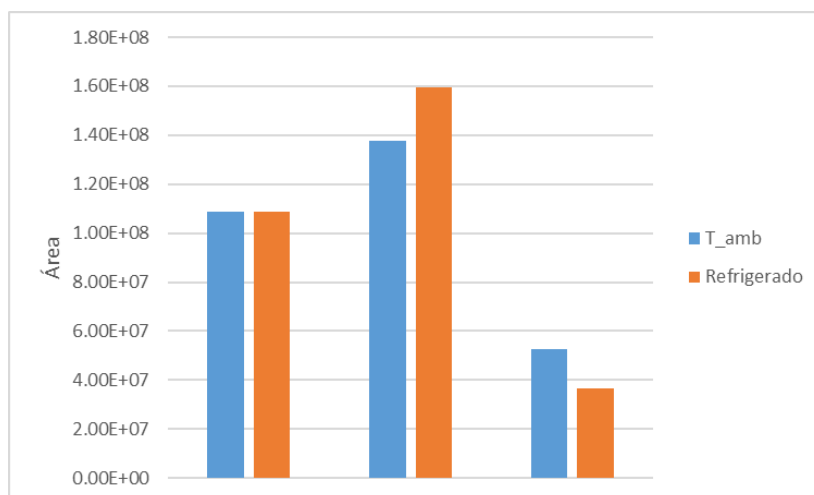


Figura 6.16 - Variação da área da oxima de formaldeído em função da idade da solução padrão à temperatura ambiente e refrigerada.

6.3.3. Estudo de linearidade e gama de trabalho

O estudo da linearidade foi implementado utilizando a técnica SPME-GC/MS no modo SIM.

Inicialmente a avaliação da linearidade foi feita com recurso a 10 soluções padrão com diferentes concentrações dentro da gama de trabalho escolhida, 0,5 µg/L a 5 µg/L. Para verificar a linearidade da gama de concentrações, representou-se graficamente a área dos picos cromatográficos obtidos em função das concentrações da oxima de formaldeído, com aplicação do método dos mínimos quadrados (Anexo B). Na figura 6.17 encontram-se os resultados obtidos.

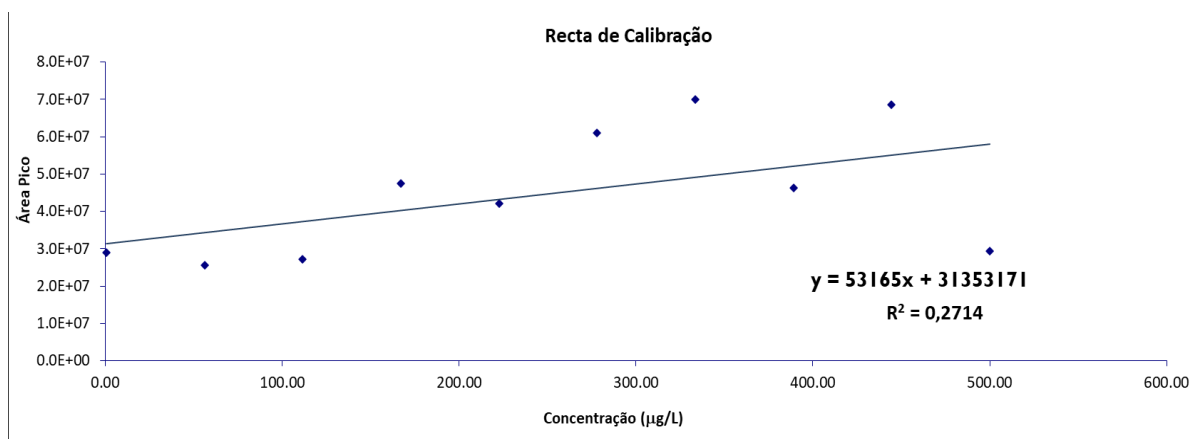


Figura 6.17 – Reta de calibração da oxima de formaldeído na gama de trabalho 0,5µg/L a 5µg/L.

Pela figura 6.17 verifica-se que esta gama de concentrações não demonstra linearidade, produzindo retas com coeficiente de determinação (R^2) muito inferior ao esperado (0,271 em vez de 0,995). Estes resultados podem ter três razões possíveis: saturação do liner, saturação da fibra ou gama de trabalho inadequada.

De modo a impedir a saturação do liner aumentou-se a temperatura do injetor (de 200 °C para 230 °C) e passou-se de *splitless* para *split* 25:1; para impedir a saturação da fibra diminuiu-se o tempo de adsorção para 15 minutos. Como nenhum dos testes anteriores fez efeito na melhoria da linearidade, experimentou-se alargar a gama de trabalho.

Deste modo, modificou-se a gama de trabalho para 0,5 µg/L a 500 µg/L e recorreu-se a 7 soluções padrão de trabalho com diferentes concentrações, apresentadas na tabela 5.1.

Para verificar a linearidade da nova gama de trabalho escolhida, representou-se graficamente a área dos picos obtidos em função das concentrações de formaldeído, com aplicação do método dos mínimos quadrados (Anexo B). Na figura 6.18 encontra-se os resultados obtidos.

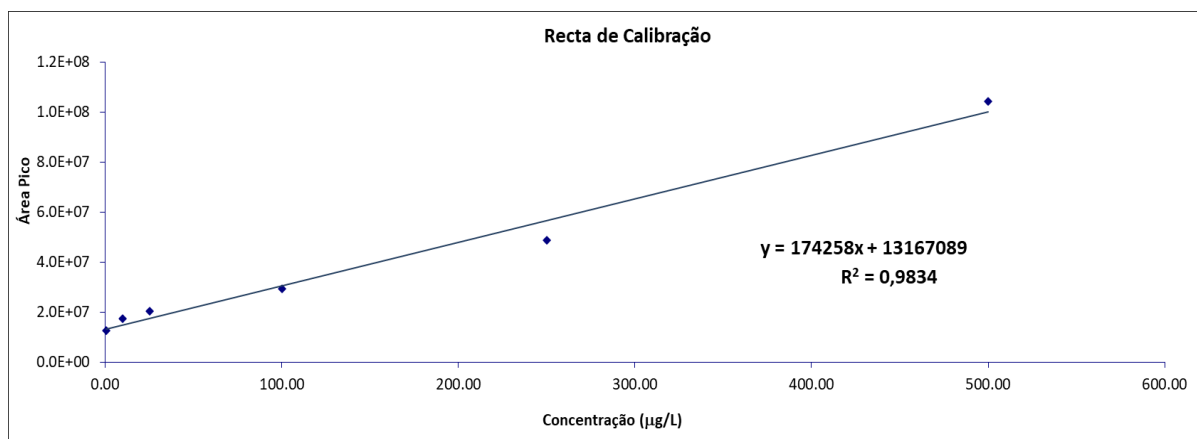


Figura 6.18 – Reta de calibração da oxima de formaldeído, para a gama de trabalho 0,5µg/L a 500µg/L.

Para confirmar a existência de linearidade pelo método dos mínimos quadrados é necessário cumprir três requisitos. O primeiro é a distribuição equitativa dos pontos experimentais ao longo da gama de trabalho escolhida. Os outros dois requisitos exigem que o coeficiente de correlação, R , seja no mínimo 0,995 e que o limite de quantificação, calculado a partir do desvio padrão da reta de calibração, deve ser inferior à menor concentração da gama de trabalho. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 6.1.

Tabela 6.1 - Resumo dos resultados da aplicação do método dos mínimos quadrados.

Composto	Gama de linearidade (µg/L)	Coefficiente de correlação	Limite de quantificação (µg/L)
Formaldeído	0,5–500	0,9916	285,37

Dos resultados da tabela 6.1 e pela análise de resíduos (Anexo B), onde se verificou que não existe uma distribuição aleatória dos pontos experimentais, verifica-se que o desvio padrão residual da reta não pode ser usado para determinar o limite de quantificação deste método.

De notar ainda que um limite de correlação inferior a 0,995 é um requisito teórico dos métodos analíticos sem derivatização, pelo que para o método em estudo o critério de aceitação para este parâmetro deverá ser reavaliado.

O estudo da linearidade pode também ser feito com recurso ao teste de *Mandel* (Anexo C), que, ao contrário do método dos mínimos quadrados, confirmou um bom ajuste dos pontos experimentais, sendo o valor de teste (VT) inferior ao valor crítico (F) (valor calculado em função dos graus de liberdade dos ajustes linear e polinomial), como demonstrado na tabela 6.2.

Tabela 6.2 - Resumo dos resultados obtidos da aplicação do teste de Mandel.

Valor teste (VT)	Valor crítico (F)
9,558	10,13

Em complemento aos estudos da linearidade anteriores, realizou-se ainda o teste de *Rikilt* (Anexo D), onde se verifica que a quantificação não pode ser simplesmente feita por fator de resposta, sendo obrigatório o uso de uma reta de calibração na quantificação do formaldeído, uma vez que todos os padrões da gama de concentração ultrapassam os limites estabelecidos pelo teste.

Para futura referência, uma solução possível para que se possa quantificar o formaldeído pelo fator de resposta é expandir ou mudar a gama de concentrações até ser possível o cumprimento dos requisitos do teste de *Rikilt*.

No teste das áreas normalizadas (Anexo E), os resultados obtidos para o formaldeído também não cumprem os requisitos do teste, apresentando pontos fora dos limites estabelecidos.

Para completar a validação do método, procedeu-se à realização do teste da homogeneidade de variâncias (Anexo F) para a definição da gama de trabalho. Verificou-se que existem diferenças significativas entre as variâncias dos padrões de menor e maior concentração, ou seja, o valor de teste (PG) calculado é superior ao valor tabelado da distribuição de *Fisher*, como se verifica pelos valores apresentados na tabela 6.3. A razão destes resultados pode ser fundamentada pela variabilidade associada ao uso da técnica de SPME.

Tabela 6.3 - Resumo dos resultados obtidos da aplicação do teste da homogeneidade das variâncias.

Valor teste (PG)	Valor crítico F
54,86	6,3

Os testes estatísticos acima referidos não cumprem os critérios de aceitação definidos, pelo que não é possível aceitar a gama de trabalho estudada. Este estudo deverá ser novamente efetuado em futuros desenvolvimentos deste método de ensaio.

6.3.4. Sensibilidade do método

A sensibilidade de um método analítico consiste na capacidade de distinguir pequenas diferenças de concentração do analito. Neste método, a curva de calibração é definida por um modelo linear, o que reflete na constante de sensibilidade ao longo de toda a gama de trabalho. Consequentemente, pode-se considerar que a sensibilidade corresponde ao declive da reta de calibração, tomando, assim, o valor apresentado na tabela 6.4.

Tabela 6.4 - Sensibilidade do método.

Composto	Sensibilidade
Formaldeído	174258

6.3.5. Limiares analíticos

A determinação teórica dos limiares analíticos deste método de ensaio (Anexo G) foi efetuada com recurso a duas metodologias diferentes, previamente detalhados no subcapítulo 4.2.3.2.

A primeira metodologia foi efetuada com base nos estudos de precisão, em condições de repetibilidade, onde se calcula o desvio padrão de dez injeções do padrão de calibração correspondente à menor concentração da gama de trabalho estudada. Os limites de quantificação e deteção obtidos neste método encontram-se na tabela 6.5.

Tabela 6.5 - Limites de quantificação (LOQ) e deteção (LOD) obtidos para o formaldeído através da repetibilidade.

Repetibilidade	
LOQ (µg/L)	1,03
LOD (µg/L)	0,34

O DL 83/2011 de 20 de junho estipula que os limites de quantificação sejam no máximo 30% do valor paramétrico. No caso do formaldeído, esse seria de 225 µg/L em relação ao valor guia da iniciativa 4MS da *Umwelt Bundesamt* e de 300 µg/L em relação ao valor guia do *Standard NSF/ANSI 60* de 2016. Como se pode verificar pela tabela 6.5, o formaldeído cumpre essas especificações.

O segundo método para a determinação dos limites de quantificação e deteção é o da razão sinal/ruído, S/N, para a concentração correspondente ao padrão inferior da gama de concentrações, cujos resultados obtidos se encontram na tabela 6.6.

Tabela 6.6 - Limiares analíticos determinados para o padrão com concentração mais baixa da gama de trabalho.

	S/N (médio)	LOQ (µg/L)	LOD (µg/L)
Ptp S/N	158,74	0,031	0,009
RMS S/N	470,42	0,011	0,003

Analisando a tabela 6.6 é possível confirmar que o método da razão S/N produz valores para os limiares analíticos significativamente inferiores aos das duas metodologias anteriormente adotadas, seguindo, nesse sentido, os requisitos presentes no DL 83/2011 de 20 de junho.

6.3.6. Precisão

A avaliação da precisão do método foi realizada em condições de repetibilidade e de precisão intermédia.

- **Repetibilidade**

A determinação da repetibilidade do método de ensaio foi efetuada através de dez medições do mesmo padrão, sob as mesmas condições analíticas e na mesma matriz. Este procedimento poderá ser repetido em inúmeros padrões com diferentes níveis de concentração, sendo satisfatória apenas a determinação da repetibilidade nos extremos da gama de trabalho, pois são os padrões que mais facilmente sofrem desvios.

A avaliação da repetibilidade foi efetuada através do cálculo do desvio padrão relativo, RSD, para as duas gamas de concentração. A tabela 6.7 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 6.7 - Resultados obtidos para a repetibilidade nas duas gamas de concentração testadas.

	Concentração (µg/L)	RSD (%)
Gama baixa	0,5	20%
Gama alta	500	40%

De acordo com o DL 306/2007 de 27 de agosto, legislação antiga para águas de consumo, a característica de desempenho dos métodos usados para a análise de compostos orgânicos indica que o desvio padrão relativo, RSD, deve ser inferior a 25%. Analisando a tabela 6.7, é possível observar que o desvio padrão

se encontra abaixo do indicado apenas para a concentração mais baixa da gama de trabalho, cumprindo assim os requisitos de precisão do método, em condições de repetibilidade, apenas para esta concentração.

- **Precisão intermédia**

A precisão também pode ser avaliada em condições de precisão intermédia, que consiste na análise dos padrões nas concentrações extremas da gama de trabalho, ao longo de dez dias e com intervalos temporais diferentes entre cada análise.

Foram calculados os desvios padrão relativos, RSD, correspondentes às duas concentrações analisadas e os seus resultados encontram-se na tabela 6.8.

Tabela 6.8 - Resultados obtidos para a precisão intermédia nas duas gamas de concentração testadas.

	Concentração (µg/L)	RSD (%)
Gama baixa	0,5	35%
Gama alta	500	37%

Comparativamente à repetibilidade, é aceite um desvio padrão relativo até 25% para a precisão intermédia, o que, pelos resultados da tabela 6.8, não se verifica para o formaldeído nas duas gamas testadas.

É de notar que no estudo da precisão, os resultados do ensaio de repetibilidade são mais significativos que os da precisão intermédia, pois, na prática, não haverá um espaçamento temporal tão díspar como o efetuado neste estudo, tanto para as análises das amostras como para as respetivas calibrações.

6.3.7. Ensaio de recuperação

Como já foi referido no subcapítulo 4.4.3, o objetivo dos ensaios de recuperação consiste na verificação da existência de efeitos sistemáticos introduzidos por causas desconhecidas, também conhecido por efeito de matriz. Este efeito baseia-se na presença de interferentes característicos de determinadas matrizes, que causam um aumento ou diminuição da resposta analítica.

Para tal, as percentagens de recuperação foram determinadas fortificando quatro matrizes com as concentrações dos extremos da gama de trabalho. A matrizes fortificadas foram: água de consumo humano, duas águas superficiais (rio Tejo e albufeira de Castelo de Bode) e uma água subterrânea.

• Análise de brancos

No momento da análise dos ensaios de recuperação, foi primeiro analisado um branco de cada uma das matrizes de modo a verificar a existência de interferentes, neste caso o formaldeído, que possam de algum modo influenciar os resultados obtidos.

É de notar que para a matriz de água de consumo, sendo esta uma água tratada com cloro, foi adicionado tiosulfato de sódio de modo a diminuir a existência e/ou formação de interferentes.

Foram detetados vestígios de formaldeído nas quatro matrizes utilizadas. De modo a obter resultados rigorosos, foi subtraída a concentração de formaldeído encontrada no branco à concentração existente nas amostras fortificadas.

De modo a tentar determinar a origem da contaminação foi analisado um *vial* vazio, onde mais uma vez se verificou a existência de formaldeído. Na figura 6.19 está apresentado um diagrama causa-e-efeito com as possíveis causas desta contaminação.

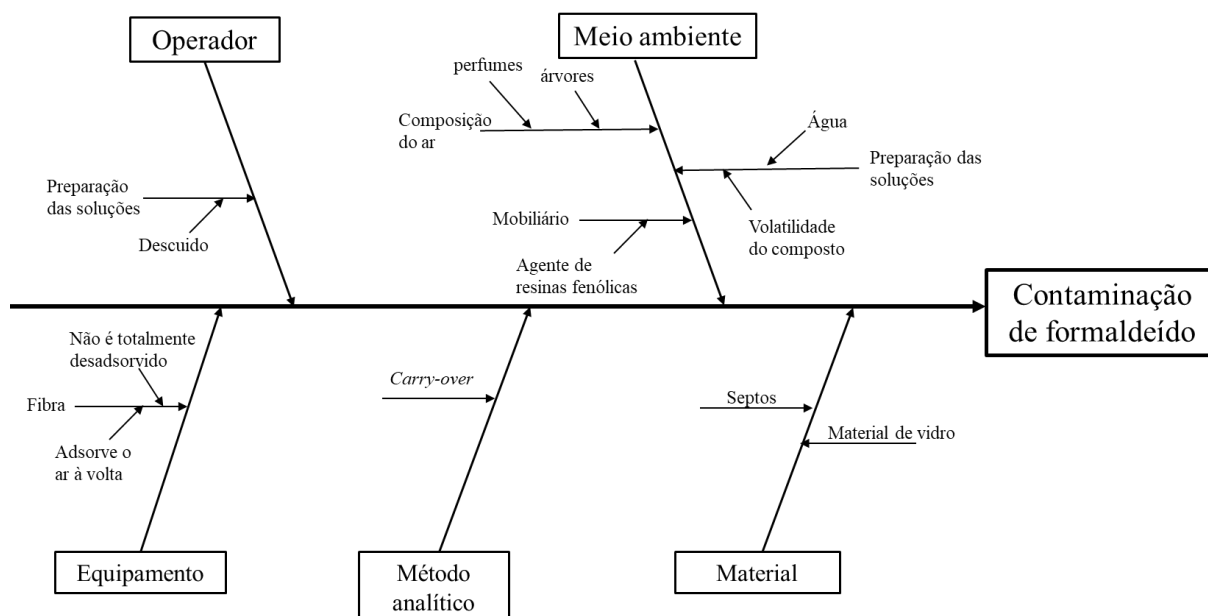


Figura 6.19 - Causas prováveis para a contaminação de formaldeído nas amostras.

Após vários testes realizados de modo a desvendar a possível causa desta contaminação, concluiu-se que esta é de origem ambiental, pois devido à volatilidade do formaldeído ficam vestígios do mesmo na sala onde é preparada a amostra e estes são detetados no momento da análise.

- **Determinação da percentagem de recuperação**

A percentagem de recuperação foi determinada utilizando a equação 4.10, referida no subcapítulo 4.3.3. As quatro matrizes estudadas foram fortificadas com dois níveis de concentração e para $n=6$. Os resultados obtidos para as matrizes em estudo estão apresentados na tabela 6.9.

Tabela 6.9 - Percentagens de recuperação obtidas nas quatro matrizes estudadas para $n=6$.

	Gama baixa (0,5 µg/L)		Gama alta (500 µg/L)	
	Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)
Água de consumo humano	93	10	116	7
Rio Tejo	94	10	89	29
Castelo de Bode	99	12	96	10
Água subterrânea	92	16	-	-

Através da análise da tabela 6.9, verifica-se que o método analítico apresenta boa exatidão, com as percentagens de recuperação de todas as matrizes estudadas dentro dos critérios de aceitação estabelecidos, isto é, entre 80% e 120% e com o respetivo desvio padrão relativo abaixo dos 25% para as duas concentrações à exceção da concentração de gama alta da captação do Rio Tejo, considerando-se mesmo assim os resultados como satisfatórios.

6.3.8. Incertezas

A incerteza é provavelmente dos parâmetros que levanta maior desentendimento entre a comunidade analítica, visto que existem inúmeras formas de alcançar a sua determinação. Ainda assim, é dos critérios que confere maior confiança na validade do resultado obtido. Na avaliação da estimativa da incerteza do método foram consideradas apenas duas das três metodologias diferentes mencionadas no subcapítulo 4.4. Nas tabelas 6.10 a 6.11, encontram-se os resultados obtidos de acordo com o Guia *Nortest* e com o ISO 11352, respetivamente.

Tabela 6.10 - Resultados obtidos para a estimativa da incerteza do método de acordo com o Guia Nordtest.

$U_{\text{precisão}} (\%)$	$U_{\text{exatidão}} (\%)$	$u_c (\%)$	$U (\%)$
11,0	2,4	11,3	22,6

Tabela 6.11 - Resultados obtidos para a estimativa da incerteza do método de acordo com o ISO 11352.

$U_{\text{precisão}} (\%)$	$U_{\text{exatidão}} (\%)$	$u_c (\%)$	$U (\%)$
11,0	12,1	16,3	32,4

De forma a compreender o nível de aceitação dos valores obtidos para a incerteza expandida pelas duas metodologias utilizadas, foi necessário recorrer ao enquadramento legal. De acordo com o DL 83/2011 de 20 de junho, relativo a águas superficiais e subterrâneas, a incerteza associada a uma medição de um parâmetro químico deve ser inferior a 50%. Por outro lado, de acordo com o DL 152/2017, relativo à qualidade da água para consumo, a incerteza associada a uma medição deve variar entre 30 e 50% para compostos orgânicos. O formaldeído não é mencionado em nenhuma das legislações acima descritas, no entanto, como composto orgânico, deverá ser comparado aos mesmos e tomar 50% como o valor máximo teoricamente admissível.

Nesse sentido e observando as tabelas 6.10 a 6.11, no qual as incertezas foram calculadas em função do padrão de concentração mais baixa da gama de trabalho, é possível concluir que, para todas as metodologias aplicadas, as incertezas expandidas obtidas apresentam valores satisfatórios.

Na figura 6.20 estão expressos os fatores que possam ter contribuído para os valores de incertezas obtidos num diagrama causa-e-efeito.

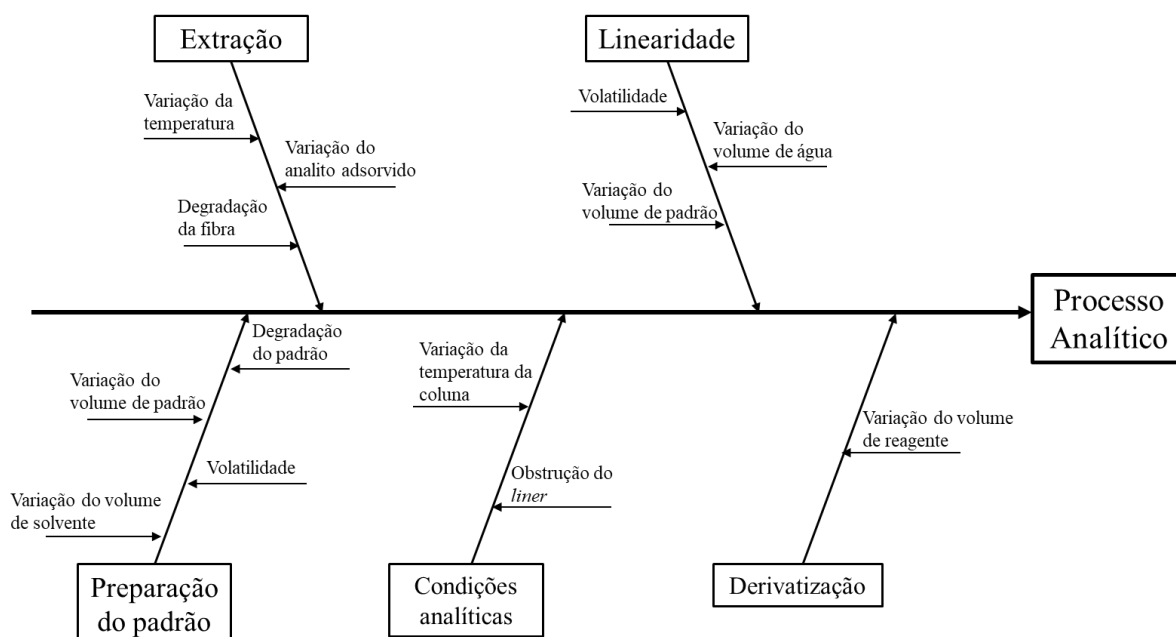


Figura 6.20 - Causas prováveis para a variabilidade dos resultados obtidos.

Adicionalmente, através do estudo das incertezas e usando a incerteza expandida pela metodologia do ISO 11352 foi possível expressar os resultados dos dois extremos da gama de concentrações em termos de algarismos significativos, com um algarismo significativo observado na tabela 6.12 e dois na tabela 6.13.

Tabela 6.12 - Expressão de resultados da gama de trabalho usando 1 algarismo significativo na incerteza da medição.

Gama baixa (µg/L)	Gama alta (µg/L)
1,0 ± 0,3	5E+02 ± 2E+02

Tabela 6.13 - Expressão de resultados da gama de trabalho usando 2 algarismos significativos na incerteza da medição.

Gama baixa (µg/L)	Gama alta (µg/L)
1,00 ± 0,33	50E+01 ± 18E+01

7. Conclusões e propostas de trabalho futuro

Nesta dissertação foi desenvolvido um método de validação que permitiu a análise de formaldeído em águas pelo método SPME-GC/MS. Os resultados obtidos a partir desta metodologia permitem concluir que este método não é adequado para a realização de análises de rotina deste composto, caso seja necessária a quantificação de formaldeído numa amostra de água.

No entanto, esta metodologia pode ser usada como ensaio limite, apenas garantindo a presença de formaldeído abaixo do limite de quantificação estabelecido para o método de ensaio.

A realização do trabalho incidiu em duas fases: a otimização do SPME e do método cromatográfico e a validação do método otimizado. A primeira fase, cujos resultados estão apresentados na tabela 7.1, tem como objetivo obter a melhor sensibilidade possível na resposta analítica do composto alvo, mesmo face à variabilidade associada à técnica de SPME.

Tabela 7.1 - Resumo dos resultados obtidos da otimização do método.

Parâmetros	PFBHA	Formaldeído
Pré-incubação (min)	15	4
Tipo de fibra	PDMS/DVB	PDMS/DVB
Tempo de adsorção (min)	25	4
Temperatura de adsorção (°C)	50	50
Tempo de desadsorção (min)	7	0
Agitação (rpm)	250	250
Modo de extração	75% <i>headspace</i>	50% <i>headspace</i>
Tempo de <i>splitless</i> (min)	1	1

Na segunda fase do trabalho, os estudos de linearidade fundamentaram-se em vários testes estatísticos com o objetivo de comprovar a linearidade e avaliar qual o método de quantificação a utilizar. O método dos mínimos quadrados foi o primeiro a ser realizado e a apresentar uma linearidade abaixo dos requisitos de métodos analíticos sem derivatização ao obter coeficientes de correlação inferiores a 0,995. Este método permitiu ainda concluir que o desvio padrão residual da reta não pode ser utilizado para quantificar o formaldeído. Os limites de quantificação e deteção foram calculados, então, pela precisão do método, em condições de repetibilidade, com os seus resultados expressos na tabela 7.2.

Tabela 7.2 - Limites de quantificação e detecção obtidos pela repetibilidade do método.

LOQ (µg/L)	LOD (µg/L)
1,03	0,34

Os demais testes estatísticos, tal como o anterior, na sua maioria não obtêm resultados satisfatórios em relação à linearidade do método e à gama de trabalho escolhida, como se pode verificar pela tabela 7.3.

Tabela 7.3 - Resumo dos resultados obtidos da aplicação dos diversos testes estatísticos.

<i>Mandel</i>	<i>Rikilt</i>	Áreas normalizadas	Homogeneidade de variâncias
✓	×	×	×

Foram também determinados os limiares analíticos por duas metodologias diferentes: a partir dos estudos de repetibilidade e da razão S/N. Verificou-se que em ambos os casos os resultados cumprem o especificado pelo DL 83/2011 de 20 de junho, isto é, são inferiores a 30% do valor guia tanto da iniciativa 4MS da *Umwelt Bundesamt* como do *Standard NSF/ANSI 60* de 2016.

Em relação aos estudos de precisão, em condições de repetibilidade e de precisão intermédia dos extremos da gama de trabalho, a variabilidade obtida foi inferior a 40%.

No estudo da exatidão, através dos ensaios de recuperação a quatro matrizes diferentes (água de consumo humano, duas águas superficiais e uma água subterrânea) na concentração mais alta e mais baixa da gama de trabalho, obtiveram-se resultados satisfatórios com percentagens de recuperação de 89 a 116% e respetivo desvio padrão relativo inferior a 25%.

Para completar a validação do método, foi estimada a incerteza expandida do método de ensaio por duas metodologias diferentes e os resultados foram dados como satisfatórios ao se verificar que o formaldeído se encontra abaixo do limite proposto de 50%, estipulado no DL 83/2011 de 20 de junho.

Em síntese, o trabalho desenvolvido no âmbito desta dissertação não permitiu a implementação de um novo método analítico, dado que não se cumpriu com todos os requisitos necessários à validação de um método de ensaio.

Existem, ainda assim, fatores que de futuro, se melhorados, possam permitir comprovar a linearidade do método, permitindo, assim, a implementação do mesmo. Como por exemplo, a otimização dos parâmetros referentes ao reagente de derivatização, a utilização de um padrão interno e tentar eliminar a contaminação ambiental de formaldeído.

Em relação ao padrão interno, foi testada inicialmente a acetona d6 (27). No entanto, devido a uma contaminação ambiental da mesma no laboratório, os resultados foram inconclusivos.

Outros padrões internos possíveis de utilizar são o 1,2-bromopropano (2), decafluorobifenil (29) e 4-bromofluorobenzeno (11). No caso do padrão interno 4-bromofluorobenzeno, este foi usado num estudo científico em que o reagente de derivatização usado foi PFBOA em vez de PFBHA e, como tal, pode haver diferenças na reação de derivatização.

Em complemento, como proposta de trabalho futuro, seria também de interesse estudar outro método de análise de formaldeído, como o HPLC (63–65). Esta é uma técnica tipicamente usada para análise de formaldeído nas indústrias alimentar, farmacêutica e de cosmética.

Esta técnica iria recorrer mais uma vez à derivatização do composto (63–65) e os seus ensaios poderiam ser comparados com os do método presente, tanto em termos de sensibilidade, como em termos de custos associados ao desenvolvimento do método de análise (Anexo I), seleccionando-se depois a técnica que apresenta condições mais favoráveis.

Referências bibliográficas

1. US EPA. The History of Drinking Water Treatment. Public Health. 2000;(4606):1–4. [citado a 18 set 2020]. Disponível em: <http://www.epa.gov/ogwdw000/consumer/pdf/hist.pdf>
2. Cancho B, Ventura F, Galceran MT. Determination of aldehydes in drinking water using pentafluorobenzylhydroxylamine derivatization and solid-phase microextraction. J Chromatogr A. 2002;943(1):1–13.
3. Glaze WH. Reaction products of ozone: a review. Environ Heal Prospect. 1986;69:151.
4. Rice RG. Safe Drinking Water: The Impact of Chemicals on a Limited Resource. Chelsea, MI: Lewis Publishers; 1985.
5. Richardson SD, Thruston AD, Caughran T V., Chen PH, Collete TW, Floyd TL, et al. Identification of New Ozone Disinfection Byproducts in Drinking Water. Environ Sci Technol. 1999;33(19):3368.
6. Owen BA, Dudney CS, Tan EL, Easterly CE, World Health Organization. Formaldehyde in drinking water. World Health Organization. 2005.
7. 4MSI Common Approach. Requirements and test methods for products made of Organic Materials in Contact with Drinking Water. 2019.
8. Formaldehyde | H₂CO - PubChem. National Center for Biotechnology Information. [citado a 18 set 2020]. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/formaldehyde>
9. Wang Q, O'Reilly J, Pawliszyn J. Determination of low-molecular mass aldehydes by automated headspace solid-phase microextraction with in-fibre derivatisation. J Chromatogr A. 2005;1071(1–2):147–54.
10. World Health Organization. Guidelines for Drinking-water Quality. 2017.
11. Sugaya N, Nakagawa T, Sakurai K, Morita M, Onodera S. Analysis of aldehydes in water by head space-GC/MS. J Heal Sci. 2001;47(1):21–7.
12. 4MSI Joint Management Committee. 4MSI Common Approach on Organic Materials in Contact with Drinking Water. 2020.
13. NSF International. NSF/ANSI 60 - 2016: Drinking water treatment chemicals - health effects. 2016.
14. Ministério do Ambiente e do Ordenamento do território. Decreto-Lei nº 103/2010. Diário da República. 2010;1º série(187):4289–96.
15. EPAL - Empresa Portuguesa das Águas Livres, SA. [citado a 18 set 2020]. Disponível em: <https://www.epal.pt/EPAL/menu/epal/quem-somos>
16. EPA. Contaminant Candidate List (CCL) and Regulatory Determination. 2016 [citado a 9 jun 2021]. Disponível em: <https://www.epa.gov/ccl/chemical-contaminants-ccl-4>
17. Mitra S. Sample preparation techniques in analytical chemistry. Winefordner JD, editor. New Jersey: John Wiley & Sons; 2003.
18. Pawliszyn JB. Applications of solid phase microextraction. Smith R, editor. Ontario: The Royal Society of Chemistry; 1999.
19. Belardi RP, Pawliszyn JB. Application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns. Water Pollut Res J Canada. 1989;24(1):179.
20. Arthur C, Pawliszyn J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. Anal Chem. 1990;62(19):2145.
21. Pawliszyn J. Handbook of Solid Phase Microextraction. Elsevier. Ontario; 2012.
22. Wercinski S, Pawliszyn JB. Solid phase microextraction: a practice guide. Wercinski SAS, editor. Vol. 96, Inorganica chimica acta. California: Taylor & Francis; 1990.
23. Sulpeco. Bulletin 923 Solid phase microextraction: theory and optimization of conditions. Sigma-Aldrich. 1998.
24. Pawliszyn J. Theory of Solid-Phase Microextraction. J Chromatogr Sci. 2000;38(Julho):270–8.
25. Analytics Shop. Products for SPME - Solid Phase Micro Extraction. [citado a 29 set 2020]. Disponível em: <https://www.analytics-shop.com/us/sample-preparation/spme-solid-phase-micro-extraction.html>
26. Selecting the Appropriate SPME Fiber Coating –Effect of Analyte Molecular Weight and

- Polarity | Sigma-Aldrich. [citado a 19 out 2020]. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/reporter-eu/selecting-the-appropriate.html>
27. Trenholm RA, Rosario-Ortiz FL, Snyder SA. Analysis of formaldehyde formation in wastewater using on-fiber derivatization-solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2008;1210(1):25–9.
 28. Martos PA, Pawliszyn J. Sampling and determination of formaldehyde using solid-phase microextraction with on-fiber derivatization. *Anal Chem*. 1998;70(11):2311–20.
 29. Tsai SW, Chang CM. Analysis of aldehydes in water by solid-phase microextraction with on-fiber derivatization. *J Chromatogr A*. 2003;1015(1–2):143–50.
 30. Bao ML, Pantani F, Griffini O, Burrini D, Santianni D, Barbieri K. Determination of carbonyl compounds in water by derivatization-solid-phase microextraction and gas chromatographic analysis. *J Chromatogr A*. 1998;809(1–2):75–87.
 31. Orata F. Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis. In: Mohd MA, editor. *Advanced Gas Chromatography - Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*. Intech; 2012. p. 83–108.
 32. P. Jandera JC. Gradient Elution in Column Liquid Chromatography: Theory and Practice. *J Chromatogr Libr*. 1985;31:301–5.
 33. Luong J, Gras R, Jennings W. An advanced solventless column test for capillary GC columns. *J Sep Sci*. 2007;30(15):2480–92.
 34. Miller JM. *Chromatography: Concepts and Contrasts*. 2nd ed. Madison, New Jersey: John Wiley & Sons; 2005.
 35. Karasek FW, Clement RE. *Basic Gas Chromatography - mass spectrometry: Principles and techniques*. Ontario: El Sevier Science; 1988.
 36. Kaiser R. *Gas Phase Chromatography, Volume I*. London: Butterworths & Co.; 1963.
 37. Jennings W. *Analytical Gas Chromatography*. California: Academic Press; 1987.
 38. McMASTER Marvin C Mc. *GC / MS A Practical User's Guide. GC/MS: A Practical Use's Guide*. 2008.
 39. Dettmer-Wilde K, Engewald W. *Practical Gas Chromatography: A Comprehensive Reference*. Berlin: Springer; 2014.
 40. Jackie. *Basics & Fundamentals: Gas Chromatography*. Shimadzu Corporation. 2020.
 41. Agilent technologies - GC Capillary columns. [citado a 10 fev 2021]. Disponível em: <https://www.chem.agilent.com/cag/CABU/capgccols.htm>
 42. Hubsschmann H-J. *Handbook of GC-MS Fundamentals and Applications*. 3rd ed. Weinheim: Verlag GmbH & Co.; 2005.
 43. Dettmer-Wilde K, Engewald W, Adahchour M, de Zeeuw J, Albrecht UV, Andersson JT, et al. *Practical Gas Chromatography: A Comprehensive Reference*. Springer Heidelberg New York Dordrecht London. 2014. 902 p.
 44. Johnsen LG, Skou PB, Khakimov B, Bro R. Gas chromatography – mass spectrometry data processing made easy. *J Chromatogr A*. 2017;1503:57–64.
 45. Smith RM. *Understanding Mass Spectra—A Basic Approach*. second. Vol. 42, Carbohydrate Polymers. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons; 2004. 372 p.
 46. Hoffmann E, Stroobant V. *Mass spectrometry Principles and Applications*. 3rd ed. Brussels: John Wiley & Sons; 2007.
 47. McMaster MC. *GC/MS A Practical User's Guide*. 2nd ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons; 2008.
 48. Żymankowska-Kumon S. Ecological assessment of foundry binders from cold-box technology by gas chromatography method. *World Sci News*. 2016;(57):554–61.
 49. Boyd RK, Basic C, Bethem RA. *Trace Quantitative Analysis by Mass Spectrometry*. Chichester: John Wiley & Sons; 2008.
 50. Pinto V. *ISO/IEC 17025 - Requisitos gerais de competências para laboratórios de ensaio e calibração*. 2012.
 51. Valentini GMSR. *Validação de métodos analíticos*. 2007.
 52. Eurachem. *The Fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics*. 2014.

53. Guia Relacre 13 - Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química. Relacre. 2000.
54. Huber L. Validation of Analytical Methods. Agilent Technologies. 2010;
55. Sistema de gestão da qualidade dos laboratórios de ensaio da EPAL. Validação de métodos de ensaio cromatográficos (GC, HPLC).
56. Greg Wells, Harry Prest, Charles William Russ IV. Why Use Signal-To-Noise As a Measure of MS Performance When It Is Often Meaningless? Agilent Technologies. 2011;
57. Relacre. Guia Relacre 7 - Ensaios Interlaboratoriais em Química. 2012.
58. Walfish S. Analytical Methods : A Statistical Perspective on the ICH Q2A and Q2B Guidelines for Validation of Analytical Methods. BioPharm International. 2006.
59. Guia Relacre 31 - Quantificação da incerteza de medição em ensaios químicos e físico-químicos. Relacre. 2018.
60. Magnusson B, Näykki T, Hovind H, Krysell M. Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories. Vol. 537, Nordtest Technical Report 537. 2012.
61. ISO 11352 Water quality - estimation of measurement based on validation and quality control data. 2012.
62. Ellison SLR, Williams A. Eurachem/CITAC Guide CG 4: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurements. 2012.
63. Li J, Zhu J, Ye L. Determination of formaldehyde in squid by high-performance liquid chromatography. Asia Pac J Clin Nutr. 2007;16(SUPPL.1):127–30.
64. Soman A, Qiu Y, Chan LQ. HPLC-UV method development and validation for the determination of low level formaldehyde in a drug substance. J Chromatogr Sci. 2008;46(6):461–5.
65. Bhowmik S, Begum M, Hossain MA, Rahman M, Alam AKMN. Determination of formaldehyde in wet marketed fish by HPLC analysis: A negligible concern for fish and food safety in Bangladesh. Vol. 43, Egyptian Journal of Aquatic Research. 2017. p. 245–8.
66. van Trijp JMP, Roos AH. RIKILT Report 91.02: Model for the calculation of calibration curves. 1991.

Anexo A – Máxima concentração tolerável de aldeídos

Como já foi referido, os aldeídos podem ser libertados para o sistema de abastecimento de águas, representando possíveis riscos para a saúde humana. Devido a tal, foi estabelecido uma concentração máxima tolerável na torneira dos consumidores, MTC_{tap} , para formaldeído, como é possível observar nas tabelas A.1 e A.2 (7,12), e uma concentração máxima aceitável, MAC, como observado na tabela A.3 (13).

Tabela A.1 - Requerimentos específicos para materiais de borracha e revestimentos de resinas epoxídicas. Adaptado de (7).

Parâmetro	Restrição
Formaldeído	$MTC_{tap} = 750 \mu\text{g/L}$

Tabela A.2 - Tabela de substâncias orgânicas confirmadas que entram em contacto com a água para consumo. Adaptado de (12).

Nome	Resina de 4-tert-butilfenol formaldeído (oligómeros com $MW < 1000 \text{ Da}$: máx. 25%; grupos metilol: máx. 16%)
Usado como monómero ou outra substância inicial	Sim
Material	Borracha
Função tecnológica	Agente de reticulação
MTC (mg/L)	0,75
Restrições e especificação	Formaldeído

Tabela A.3 - Tabela de critérios para água para consumo humano do Standard NSF / ANSI 60. Adaptado de (13).

Substância	MAC (mg/L)
Formaldeído	1

Anexo B – Método dos mínimos quadrados e análise de resíduos

O método dos mínimos quadrados é o mais vulgarmente utilizado e pode ser usado como ponto de partida para validar a linearidade da gama de concentrações.

A forma algébrica da equação de uma reta é dada pela equação B.1.

$$y = mx + b \quad (\text{B.1})$$

Onde,

y é o sinal instrumental;

m é o declive da reta;

x é a concentração dos padrões utilizados;

b é a ordenada na origem.

A reta é composta por um conjunto de pares ordenados e independentes, $(x_1, y_1); \dots; (x_n, y_n)$, sendo que o ponto (x_1, y_1) normalmente pertence ao branco e n corresponde ao número de pontos utilizados na construção da reta.

A partir do coeficiente de correlação, R, representado pela equação B.2, pode-se avaliar a fiabilidade da calibração analítica.

$$R = \frac{\sum\{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sqrt{[\sum(x_i - \bar{x})^2]\{\sum(y_i - \bar{y})^2\}}} \quad (\text{B.2})$$

O coeficiente de correlação pode assumir valores entre -1 e 1. Um valor de $R=-1$ é indicativo de uma correlação negativa, $R=1$ é indicativo de uma correlação positiva e $R=0$ é sinal de que não existe correlação entre as duas variáveis.

No entanto, um coeficiente de correlação elevado não garante necessariamente uma relação linear, sendo necessário comprovar a existência de linearidade a partir de outros testes.

O cálculo dos coeficientes da reta de regressão é dado pelas equações B.3 e B.4.

$$m = \frac{\sum\{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum(x_i - \bar{x})^2} \quad (\text{B.3})$$

$$b = \bar{y} - m\bar{x} \quad (\text{B.4})$$

Onde,

x_i é o valor individual de concentração na solução padrão, em µg/L;

\bar{x} é o valor médio da concentração na solução padrão, em µg/L;

y_i é o valor individual do sinal instrumental;

\bar{y} é o valor médio do sinal instrumental.

Os coeficientes m e b dão uma estimativa da verdadeira função que é limitada pela dispersão do método. Para quantificar a precisão dessa estimativa, recorre-se à determinação do desvio padrão residual, $S_{y/x}$, dado pela seguinte equação.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum\{y_i - (b + mx_i)\}^2}{N-2}} \quad (\text{B.5})$$

Onde,

$S_{y/x}$ é o desvio padrão residual;

N é o número de padrões de calibração.

O desvio padrão residual exprime a dispersão dos valores da resposta analítica em torno da curva de calibração. O $S_{y/x}$ está ainda diretamente relacionado com os desvios padrão do declive, S_m , e da ordenada na origem, S_b , como representado nas equações B.6 e B.7.

$$S_m = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{B.6})$$

$$S_b = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{N \times \sum(x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{B.7})$$

Onde,

S_m é o desvio padrão do declive;

S_b é o desvio padrão da ordenada na origem.

Estes desvios padrão podem ainda ser utilizados no cálculo dos limites de confiança dos dois coeficientes, como demonstrado nas equações B.8 e B.9.

$$b \pm t \times S_b \quad (\text{B.8}) \qquad m \pm t \times S_m \quad (\text{B.9})$$

Onde,

t é o valor da variável de t de *Student* para o nível de confiança esperado com (N-2) graus de liberdade.

Após a determinação do declive da reta e da sua ordenada na origem, pode-se calcular a concentração de uma amostra por interpolação a partir da curva de calibração, como demonstrado pela seguinte equação.

$$x_i = \frac{y_i - b}{m} \quad (\text{B.10})$$

Adicionalmente pode-se ainda calcular o desvio padrão do método, S_M , pela equação B.11, de modo a verificar das análises efetuadas e o coeficiente de variação do método, CV_M , pela equação B.12, de modo a comparar calibrações e procedimentos analíticos distintos (53).

$$S_M = \frac{S_{y/x}}{m} \times 100 \quad (\text{B.11})$$

$$CV_M = \frac{S_M}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{B.12})$$

Onde,

S_M é o desvio padrão do método;

CV_M é o coeficiente de variação do método.

- **Análise de resíduos**

A análise de resíduos é efetuada após a determinação do declive da reta de calibração e da ordenada na origem. Inicialmente determinam-se as áreas de picos estimados (y) recorrendo à equação da reta, $y = mx + b$, onde as variáveis m , x e b são conhecidas. De seguida determina-se o quociente entre os picos obtidos experimentalmente e as áreas de picos estimadas. Por fim, determinam-se os vários desvios (em percentagem) entre os valores observados e os esperados.

Ao representar graficamente (figura B.1.) os desvios em função das respetivas concentrações, é possível concluir quanto à linearidade do modelo que descreve os dados, sendo que a linearidade é verificada quando os pontos apresentam uma distribuição explicitamente aleatória (55).

- **Análise de resíduos para o formaldeído**

Tabela B.1 - Desvios relativamente à concentração-alvo para a oxima de formaldeído.

Área pico estimada	Área experimental/ área estimada	Concentração (µg/L)	Desvio (%)
13254217,83	0,95	0,5	-4,9
13254217,83	1,18	10	17,9
17523540,50	1,17	25	17,4
30592895,60	0,97	100	-3,4
56731605,80	0,86	250	-14,2
100296122,80	1,04	500	4,0

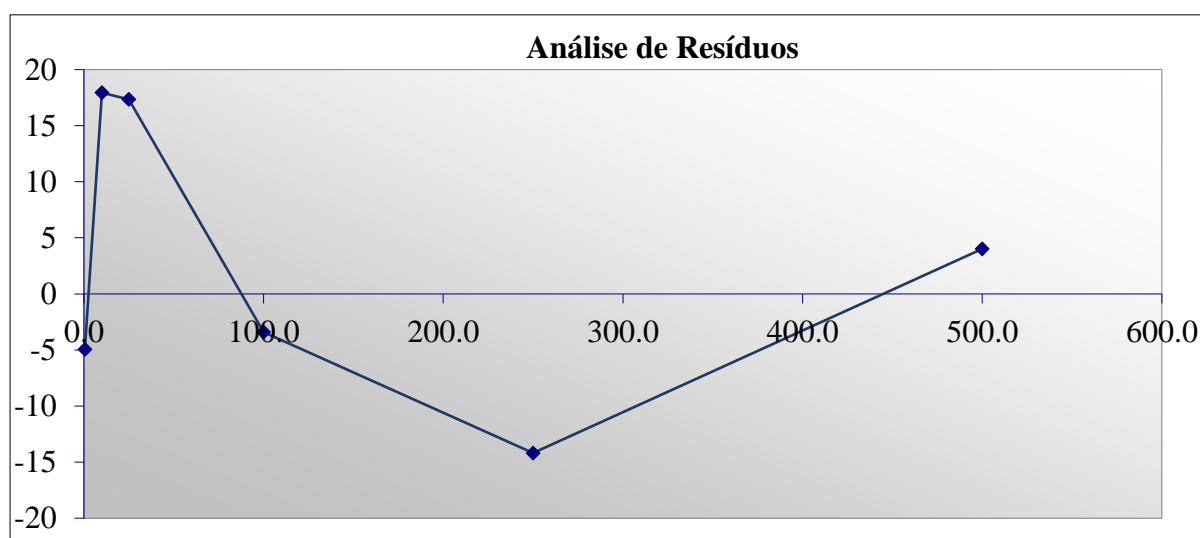


Figura B.1 - Representação gráfica da concentração da oxima de formaldeído em função dos resíduos.

Anexo C – Teste de Mandel

De acordo com as normas ISO 8466-1 e 8466-2 é recomendada a utilização do modelo estatísticos de Mandel para avaliar a linearidade. A partir dos resultados experimentais obtidos são calculadas as funções de calibração linear (ISO 8466-1) e polinomial (ISO 8466-2), bem como os respectivos desvios padrão residuais, $S_{y/x}$ e $S_{y/x(2^o)}$, através das equações C.1 e C.2.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y}_i)^2}{N-2}} \quad (C.1)$$

Onde,

y_i é o sinal analítico obtido para um padrão de determinada concentração;

\bar{y}_i é o sinal estimado pela função linear de calibração;

N é o número de padrões de calibração.

$$S_{y^2} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y}_{i(2^o)})^2}{N-3}} \quad (C.2)$$

Onde,

$\bar{y}_{i(2^o)}$ é o sinal estimado pela função polinomial de calibração.

A diferença de variâncias, DS^2 , pode ser determinada pela equação C.3.

$$DS^2 = (N - 2) \times S_{y/x}^2 - (N - 3) \times S_{y/x(2^o)}^2 \quad (C.3)$$

Por fim calcula-se o valor teste, PG , representado na equação C.4.

$$PG = \frac{DS^2}{S_{y/x(2^o)}^2} \quad (C.4)$$

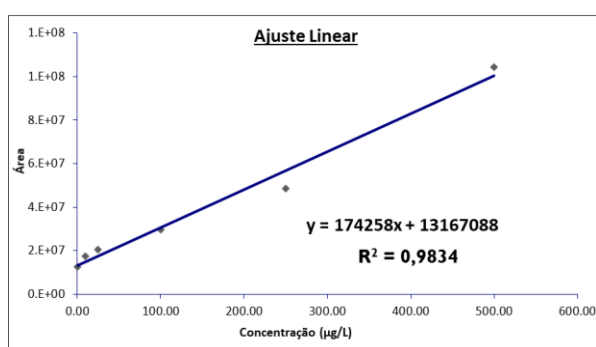
Comparando o valor teste com os valores tabelados da distribuição de *Fisher*, para um nível de significância de 95%:

- ❖ Se $PG \leq F_{\text{crítico}}$, a função de calibração é linear.
- ❖ Se $PG > F_{\text{crítico}}$, a função de calibração não é linear, sendo necessário verificar-se a possibilidade de reduzir a gama de trabalho de modo a obedecer à primeira condição. Caso não seja possível, em último caso, utiliza-se a função de calibração polinomial (53,55).

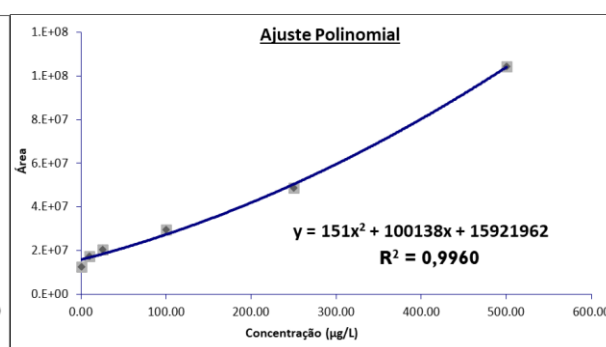
- **Teste de Mandel para o formaldeído**

Tabela C.1 - áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial para a oxima de formaldeído.

Concentração (µg/L)	Área	Área ajuste linear	Área ajuste polinomial
0,5	12599047	13254218	15972070
10	17584345	14909669	16938539
25	20565094	17523540	18520372
100	29553104	30592896	27454983
250	48682988	56731606	50451438
500	104323474	100296123	103970663



$$R = 0.9916$$



$$R = 0.9994$$

Figuras C.1 e C.2 - Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial.

Tabela C.2 e C.3 - Erros quadráticos para os dois ajustes.

$(y-y_i)^2$
4.29E+11
7.15E+12
9.25E+12
1.08E+12
6.48E+13
1.62E+13
Soma = 9.89E+13
N-2 = 4
S_{y/x} = 4.97E+06

$(y-y_i)^2$
1.14E+13
4.17E+11
4.18E+12
4.40E+12
3.13E+12
1.24E+11
Soma = 2.36E+13
N-2 = 3
S_{y/x} = 2.81E+06

$$DS^2 = (N - 2) S^2_{y/x} - (N - 3) S^2_{y/x(2^\circ)}$$

$$DS^2 = 7,53E+13$$

$$VT = DS^2 / S^2_{y/x(2^\circ)}$$

$$VT = 9,558$$

$$F_{(1,5)95\%} = 10,13$$

Como $VT < F$, a função de calibração linear conduz a um bom ajuste dos pontos experimentais.

Anexo D – Teste de *Rikilt*

Em qualquer instituição laboratorial a escolha do modo de quantificação é relevante para as análises efetuadas no dia-a-dia. O teste de *Rikilt* é essencial para esta escolha, visto permitir a análise da linearidade em cada ponto da reta de calibração.

Na realização de procedimentos analíticos em rotina, é necessário o acompanhamento de calibração, de forma a ser possível quantificar os analitos presentes na amostra. Para tal, a quantificação pode ser feita de duas formas: a primeira recorre à reta de calibração, que, dependendo da validade, pode ser efetuada diária ou mensalmente, a segunda recorre ao fator de resposta. O fator de resposta, F_r é determinado através de quatro a cinco injeções do padrão na gama mais baixa pela seguinte equação.

$$F_r = \frac{\text{área de pico do padrão}}{\text{concentração do padrão}} \quad (\text{D.1})$$

Posteriormente, F_r pode ser aplicado na determinação da concentração de analito na amostra, como demonstrado pela equação D.2.

$$[\text{analito}] = \frac{\text{área de pico da amostra}}{F_r} \quad (\text{D.2})$$

Para se poder optar pelo modo de quantificação pelo fator de resposta, é necessário que a gama de linearidade cumpra os requisitos do teste de *Rikilt*, que consistem principalmente na avaliação da dispersão de cada ponto da reta de calibração em relação aos pontos de referência considerados ótimos.

A fim da validação deste teste, calculam-se as razões área/concentração da gama de linearidade assim como a sua média. Determinam-se depois as percentagens de cada uma das razões em função da média calculada. De modo a cumprirem os requisitos do teste de *Rikilt*, os valores apresentados devem estar compreendidos entre 90% e 110%.

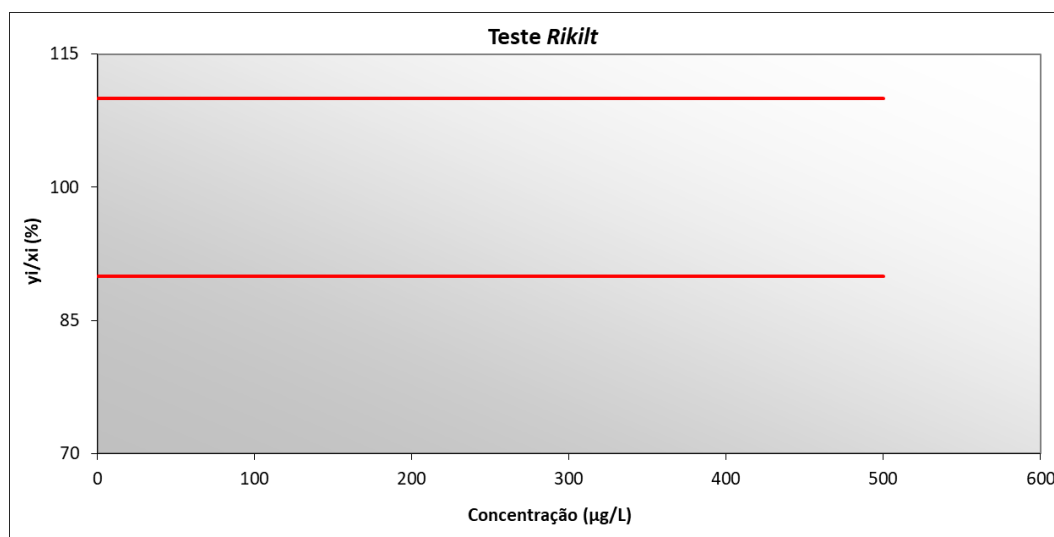
De notar que, em análises realizadas com recurso ao SPME, é utilizado mais frequentemente o método do fator de resposta devido à variabilidade associada a esta técnica, o que dificulta o uso da reta de calibração (66).

A figura D.1, apresenta a aplicação deste teste ao formaldeído.

- Teste de *Rikilt* para o formaldeído

Tabela D.1 - Cálculo das razões para o teste de *Rikilt* para a oxima de formaldeído.

Concentração ($\mu\text{g/L}$) = x_i	Área = y_i	Razão y_i/x_i	% y_i/x_i	Limite superior	Limite inferior
0,5	12599047	25198094	531	110	90
10	17584345	1758434	37	110	90
25	20565094	822603	17	110	90
100	29553104	295531	6	110	90
250	48682988	194731	4	110	90
500	104323474	208646	4	110	90
Média		4746340			

Figura D.1 - Representação gráfica do teste de *Rikilt*.

Anexo E – Teste das áreas normalizadas

O teste das áreas normalizadas é também utilizado para tirar conclusões relativamente ao método que pode ser utilizado na quantificação de analitos presentes numa amostra.

Através da equação da reta obtida pela regressão linear, estimam-se as áreas dos picos obtidas correspondentes às concentrações usadas. Para cada valor de concentração, calcula-se a razão entre a área do pico obtido experimentalmente e a área do pico estimada. A concentração que apresenta uma melhor correlação, isto é, cujo valor é mais próximo de 1, é denominada de C_{100} e considerada como valor de referência. A equação E.1 é, então, aplicada para determinar a área normalizada para cada concentração.

$$\text{área normalizada} = \frac{A_{100}C_i}{C_{100}A_i} \times 100 \quad (\text{E.1})$$

Onde,

A_{100} é a área do pico correspondente à melhor correlação;

A_i é a área de um dado pico;

C_{100} é a concentração do pico correspondente à melhor correlação, em $\mu\text{g/L}$;

C_i é a concentração de um dado pico, em $\mu\text{g/L}$.

Sempre que as áreas normalizadas apresentarem valores compreendidos entre 85% e 115%, é possível quantificar os analitos apenas pelo fator de resposta (34).

Na figura E.1, encontra-se a representação gráfica deste teste para o formaldeído.

- **Teste das áreas normalizadas para o formaldeído**

Tabela E.1 – Cálculo dos valores normalizados para a oxima de formaldeído.

Área pico estimada	Área experimental/ área estimada	Concentração ($\mu\text{g/L}$)	Valores normalizados
13254217	0,951	0,5	1,2
14909669	1,179	10	16,8
17523540	1,174	25	35,9
30592895	0,966	100	100,0
56731605	0,858	250	151,8
100296122	1,040	500	141,6

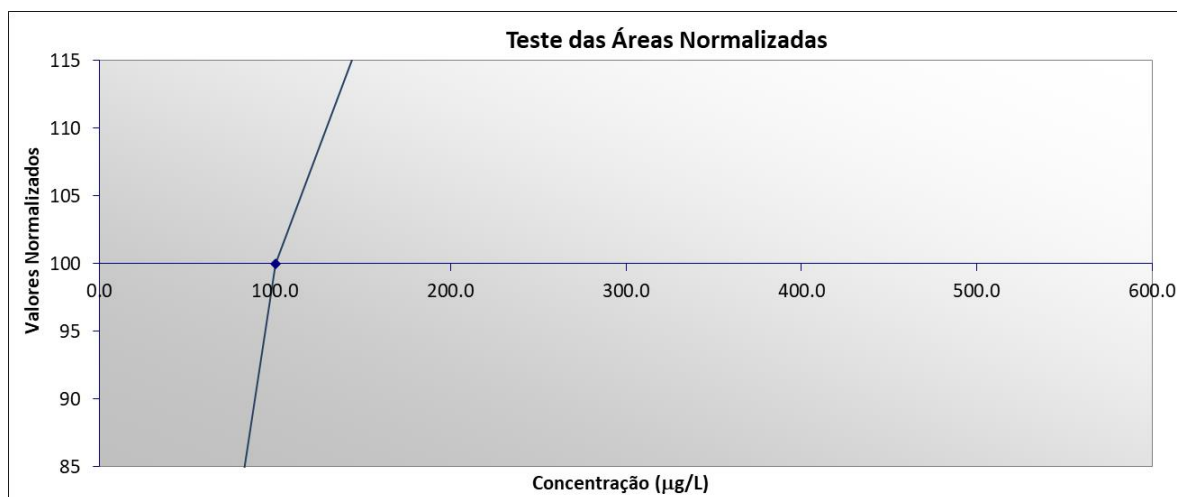


Figura E.1 - Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados.

Anexo F – Teste de homogeneidade de variâncias

O teste da homogeneidade de variâncias permite avaliar o ajuste da gama de trabalho, quando é utilizado um método que envolve a representação gráfica de uma curva de calibração.

Para a execução do teste, de acordo com a norma ISO 8466-1, recomenda-se o uso de retas com dez pontos de calibração, caso tal não ser possível, a reta deverá ter no mínimo cinco pontos, distribuídos equitativamente ao longo da gama de trabalho. O primeiro e o último padrão são analisados através de dez réplicas independentes. A variância de cada padrão foi calculada com recurso à equação F.1.

$$S_i^2 = \frac{\sum (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1} \quad (\text{F.1})$$

Onde,

i é o número do padrão;

j é o número de repetições efetuadas para cada padrão.

As variâncias são testadas para averiguar se existe diferença significativa entre elas, nos limites da gama de trabalho, com recurso ao cálculo do valor teste, PG, que contempla duas situações diferentes, demonstrado pelas equações F.2 e F.3.

$$PG = \frac{S_2^2}{S_1^2}, \text{ quando } S_2^2 > S_1^2 \quad (\text{F.2})$$

$$PG = \frac{S_1^2}{S_2^2}, \text{ quando } S_1^2 > S_2^2 \quad (\text{F.3})$$

Comparando o valor teste e o valor tabelado da distribuição F de Fisher, para N-1 graus de liberdade e para um nível de confiança de 99%:

- ❖ Se $PG \leq F_{\text{crítico}}$, a diferença de variâncias não é significativa e a gama de trabalho está bem ajustada;
- ❖ se $PG > F_{\text{crítico}}$ a diferença de variâncias é significativa e deve-se reduzir a gama de trabalho até que a diferença entre as variâncias permita obter $PG \leq F_{\text{crítico}}$ (53).

• **Teste de homogeneidade de variâncias para o formaldeído**

Tabelas F.1 e F.2 - Áreas obtidas nas duas gamas de concentração.

Concentração inferior: 0,5 µg/L

Área
22536618
34153693
13834787
24635293
15795730
52322893
34127045
21961515
29549652

Concentração superior: 500 µg/L

Área
128492168
191812306
99579761
250063452
291559688
125793075
98039521
136733470
328539723

N-1 =	8
Média =	27657469
Desvio padrão =	11702498
Desvio relativo =	42.31 (%)
Variância =	1.3695E+14

N-1 =	8
Média =	183401462
Desvio padrão =	86676320
Desvio relativo =	47.26 (%)
Variância =	7.5128E+15

Valor teste (PG) = s^2_1 / s^2_2 se $s^2_1 > s^2_2$ ou **PG = s^2_2 / s^2_1 se $s^2_2 > s^2_1$**

F_{99%} = 6,03

PG = 54,86

Uma vez que PG é superior ao F, não se pode afirmar que existe homogeneidade de variâncias na gama de trabalho estudada (0,5 a 500 µg/L).

Anexo G – Limiares analíticos (LOQ e LOD)

A determinação dos limites de detecção e quantificação foi efetuada de acordo com o descrito no subcapítulo 4.2.3.2.

De notar que durante a aplicação do método dos mínimos quadrados (Anexo B), foram já calculados os limiares analíticos através do desvio padrão residual da reta de calibração, com aplicação das equações 4.6 e 4.8.

Por este motivo, neste anexo, são apenas indicados os cálculos referentes ao modo de determinação com base na repetibilidade. Para a realização destes cálculos, o padrão correspondente à concentração mais baixa da gama de linearidade foi injetado dez vezes e foi calculado o respetivo desvio padrão. O limite de detecção foi determinado com base na equação 4.4 e o limite de quantificação pela equação 4.7.

- Limites de detecção e quantificação para o formaldeído**

Procedimento: Os limites foram detetados com recurso a $n = 9$ leituras do padrão de concentração mais baixa ($0,5 \mu\text{g/L}$).

Tabela G.1 - Áreas obtidas para o padrão da gama mais baixa.

	Área
	22536618
	34153693
	13834787
	24635293
	15795730
	52322893
	34127045
	21961515
	29549652
Média =	27657470
Desvio padrão =	11702499
Desvio relativo (%) =	42

$$\text{FR} = 4.91\text{E}+07$$

Utilizou-se o fator de resposta para determinar a concentração estimada na tabela G.2.

Tabela G.2 - Concentrações obtidas para o padrão de concentração mais baixa.

Concentração estimada (µg/L)	
0.459	
0.696	
0.282	
0.502	
0.322	
1.066	
0.695	
0.447	
0.602	
Média =	0,516
Desvio padrão =	0,103
Desvio relativo (%) =	20

LOD = 1,03 µg/L

LOQ = 0,34 µg/L

Anexo H – Estudos com outros aldeídos

De modo a criar um método mais inclusivo, para além do formaldeído, numa fase inicial deste trabalho, testaram-se ainda outros aldeídos, entre eles, o acetaldeído, a acroleína, o propanal e o butanal.

De notar que o acetaldeído, o propanal e o butanal são moléculas assimétricas. Como tal, aquando da reação com PFBHA vão formar dois isómeros, (E) e (Z), cada um com um pico cromatográfico e tempo de retenção representativo. Com base nas propriedades dos isómeros, pode-se concluir que o isómero (E) corresponderá ao pico cromatográfico com menor tempo de retenção, por ser menos polar, o que equivale a um menor momento dipolar, o que, por sua vez, equivale a uma menor temperatura de ebulição. O contrário se pode concluir em relação ao isómero (Z).

Ao realizar a análise por SPME-GC/MS em modo *full scan*, verificou-se que o isómero (E) da acroleína coeluiu com um dos isómeros do propanal. Tendo os picos de propanal maior área que os de acroleína e sendo o pico de acroleína o indistinto, decidiu-se não considerar mais este composto, sabendo que mesmo assim este será uma limitação do método.

Foi possível, mesmo assim, determinar os iões de quantificação dos compostos restantes, que se encontram representados na tabela H.1, e, recorrendo aos mesmos, procedeu-se à análise, em modo SIM, da mistura dos compostos, resultando o perfil de corrente iónica extraída representado na figura H.1.

Tabela H.1 – Representação dos tempos de retenção e iões de quantificação dos vários analitos escolhidos para o modo SIM.

Compostos	t_R (min)	Iões de quantificação (m/z)
Oxima de formaldeído	22,723	161,0; 181,1; 182,1; 195,0
Oxima de acetaldeído	25,853/26,122	161,0; 181,1; 182,0; 209,0
Oxima de propanal	28,494/28,720	181,0; 182,0; 223,0; 236,0
Oxima de butanal	31,212/31,361	181,0; 182,0; 195,0; 239,0

Geralmente, quanto maior for a quantidade de iões de quantificação maior é a interferência na identificação do composto. No entanto, neste caso, os analitos em estudo produzem iões muito semelhantes entre si, com razões m/z iguais e, como tal, foram escolhidos quatro iões de quantificação para cada composto de modo a facilitar a sua distinção.

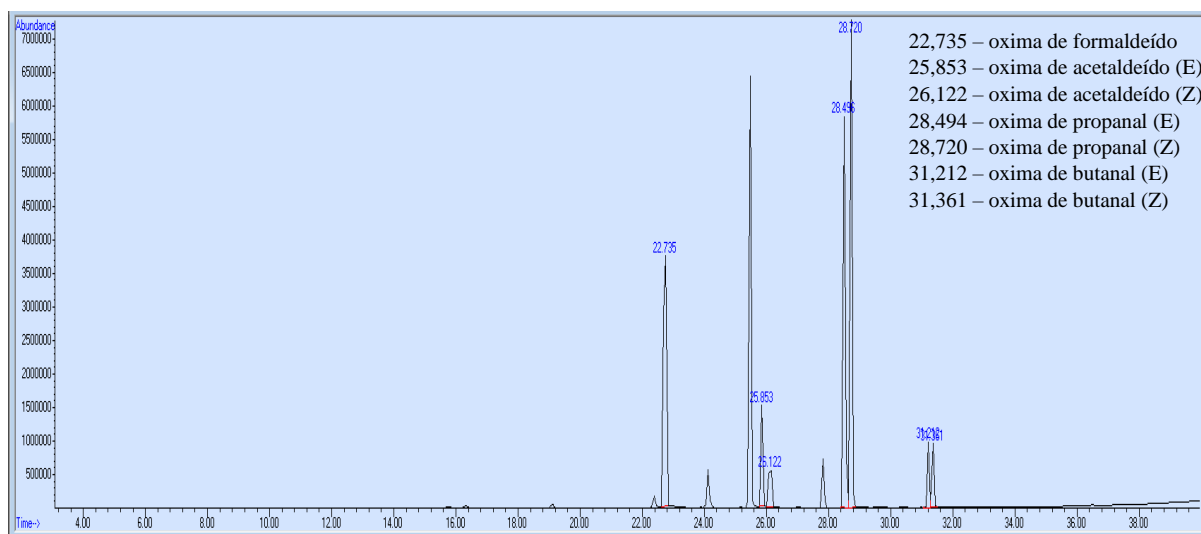


Figura H.1 - Cromatograma da solução conjunta de aldeídos.

Procedeu-se, ainda, à otimização dos parâmetros do método de SPME e do método cromatográfico realizados nos subcapítulos 6.2 e 6.3, cujos resultados se encontram nas figuras H.2 a H.11.

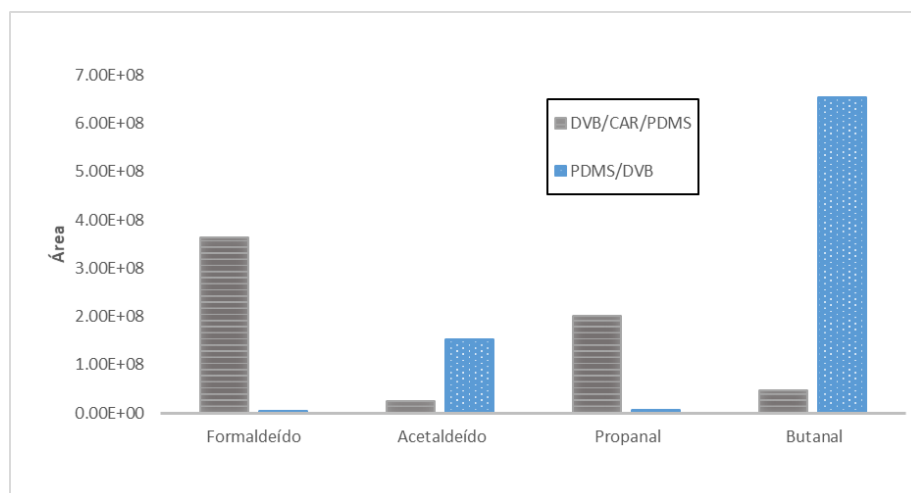


Figura H.2 - Variação das áreas dos compostos em função da fibra utilizada.

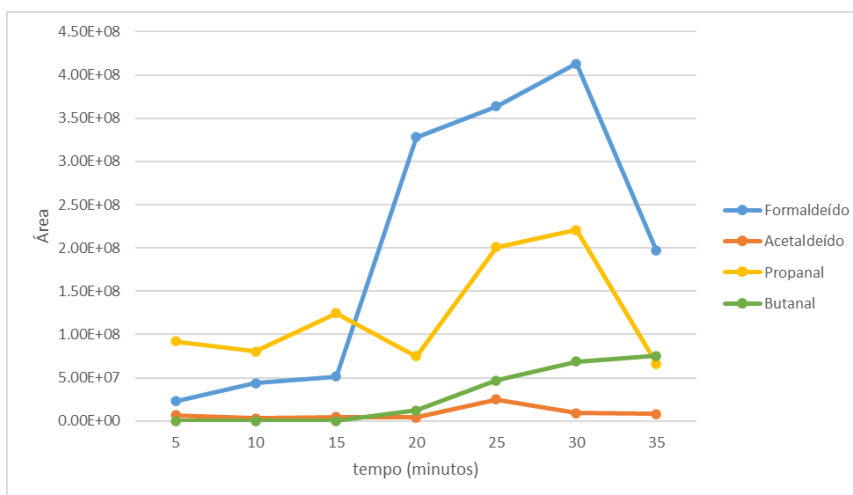


Figura H.3 - Variação das áreas dos compostos em função do tempo de extração.

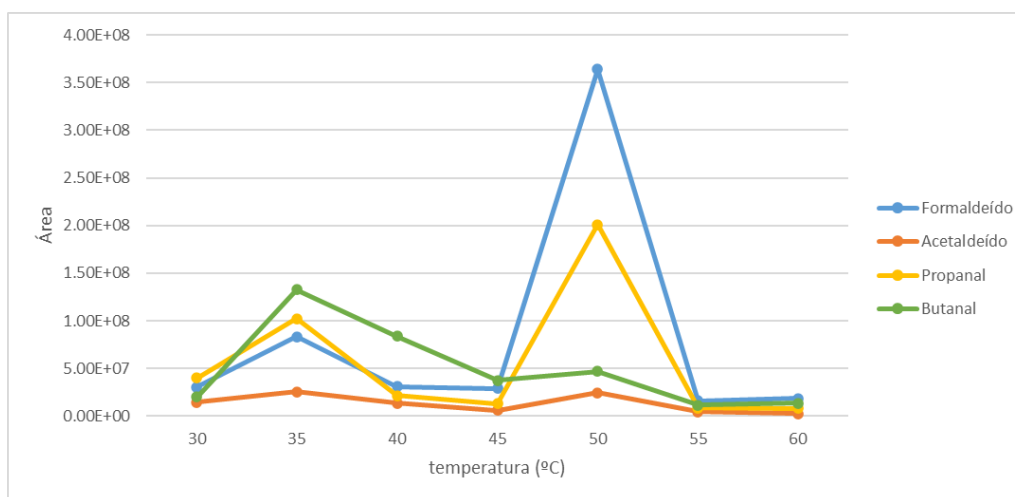


Figura H.4 - Variação das áreas dos compostos em função da temperatura de extração.

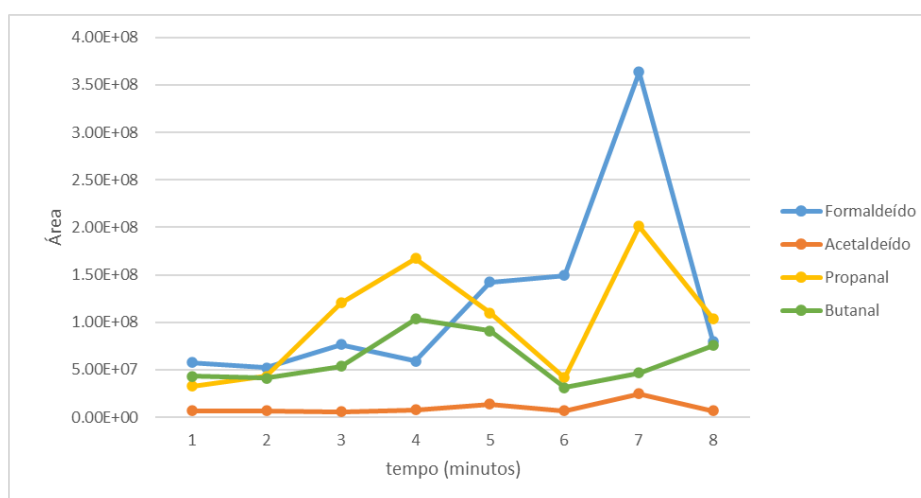


Figura H.5 - Variação das áreas dos compostos em função do tempo de desadsorção.

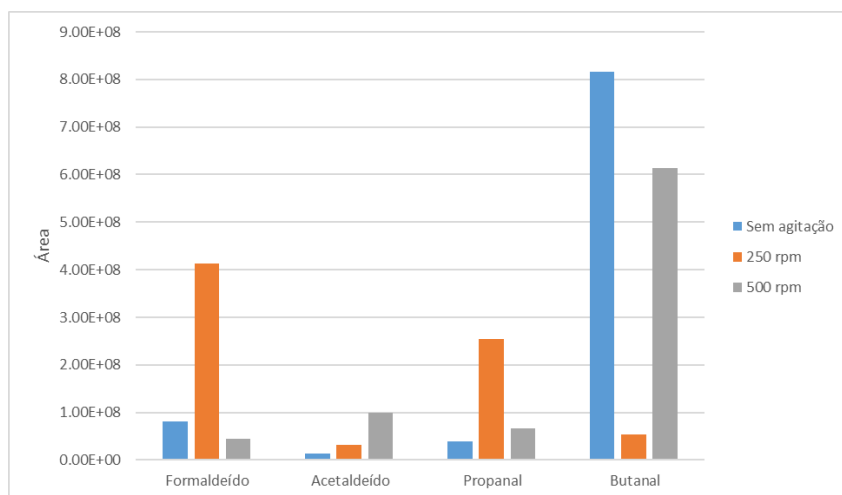


Figura H.6 - Variação das áreas dos compostos em função da agitação utilizada.

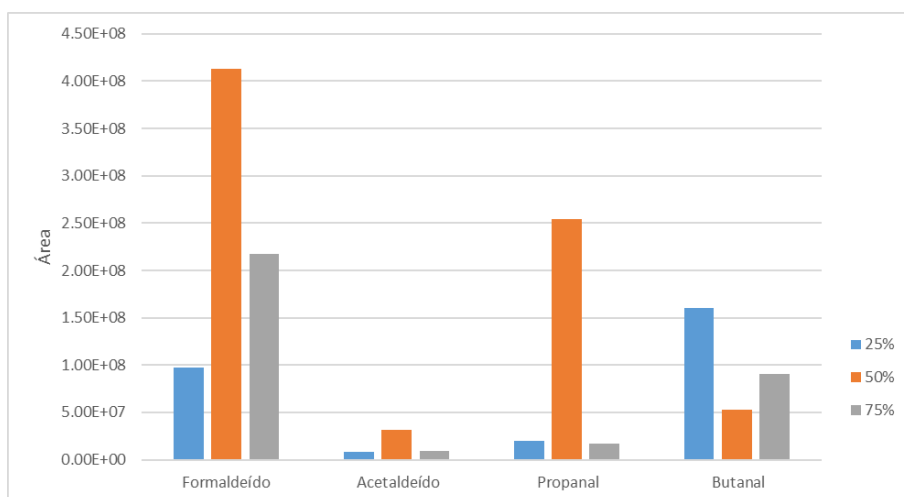


Figura H.7 - Variação das áreas dos compostos em função do volume de headspace.

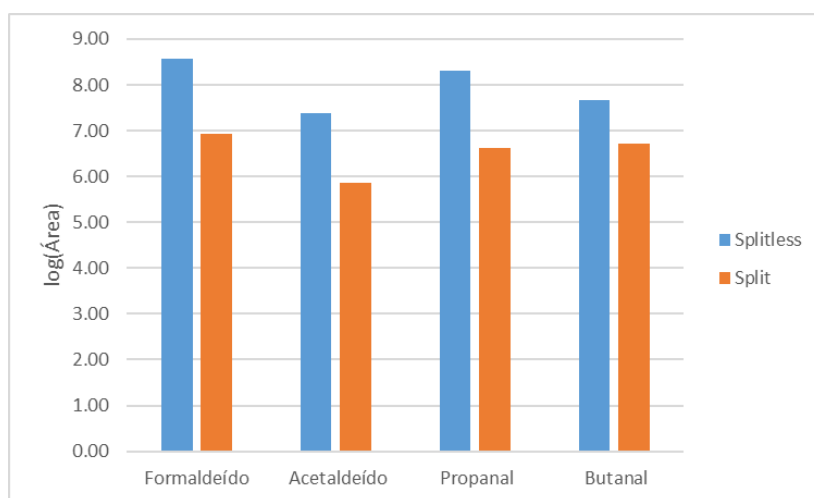


Figura H.8 - Variação das áreas dos compostos em função do modo splitless e split.

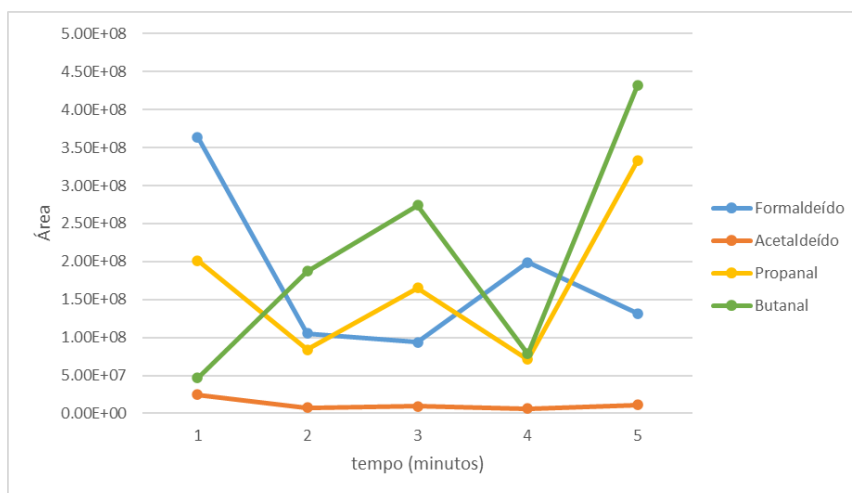


Figura H.9 - Variação das áreas dos compostos em função do tempo de splitless.

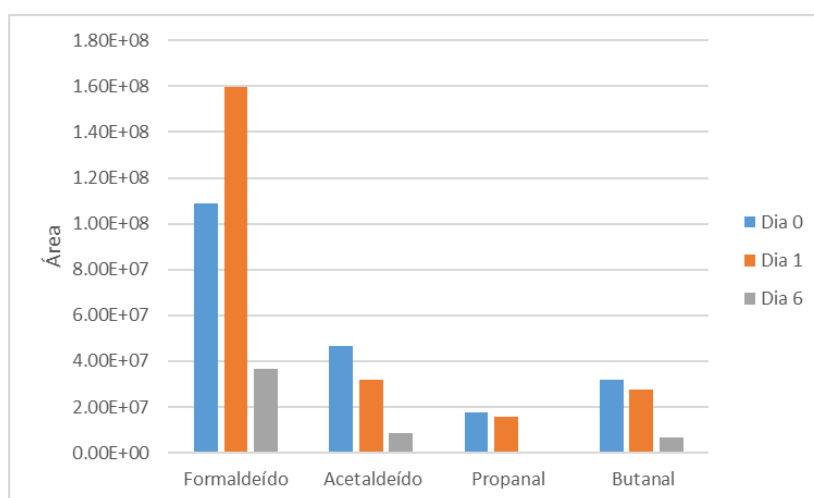


Figura H.10 - Variação das áreas dos compostos em estudo em função da idade da solução padrão refrigerada.

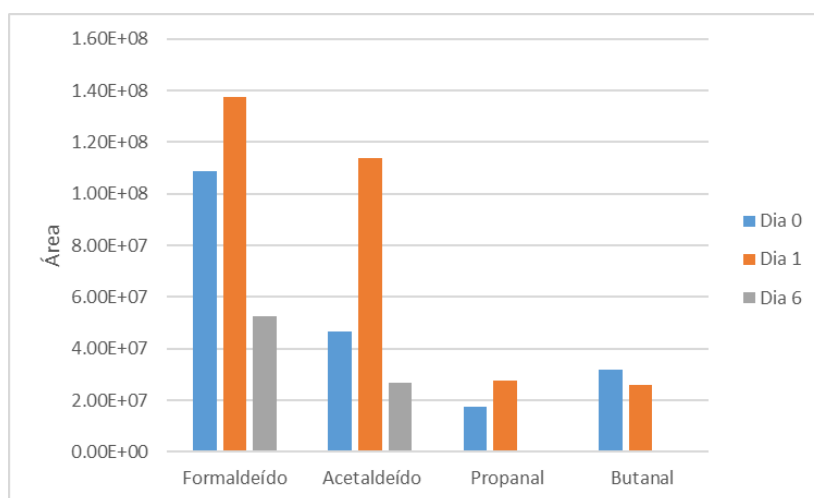


Figura H.11 - Variação das áreas dos compostos em estudo em função da idade da solução padrão à temperatura ambiente.

Pela análise das figuras H.2 a H.11, verifica-se que, se se procedesse à análise da mistura dos aldeídos selecionados, o método se manteria semelhante ao obtido para o formaldeído, com exceção do tempo de *splitless* que passaria para 5 minutos.

Após a otimização, foi iniciada a validação do método cromatográfico para permitir futuras análises.

Para o estudo da linearidade foram utilizadas 10 soluções padrão de trabalho a diferentes concentrações dentro da gama 0,5µg/L a 5µg/L. Para verificar a linearidade da gama, representou-se graficamente a área dos picos obtidos em função das concentrações, para cada composto com aplicação do método dos mínimos quadrados (Anexo B). Os resultados obtidos estão apresentados nas figuras H.12 a H.15.

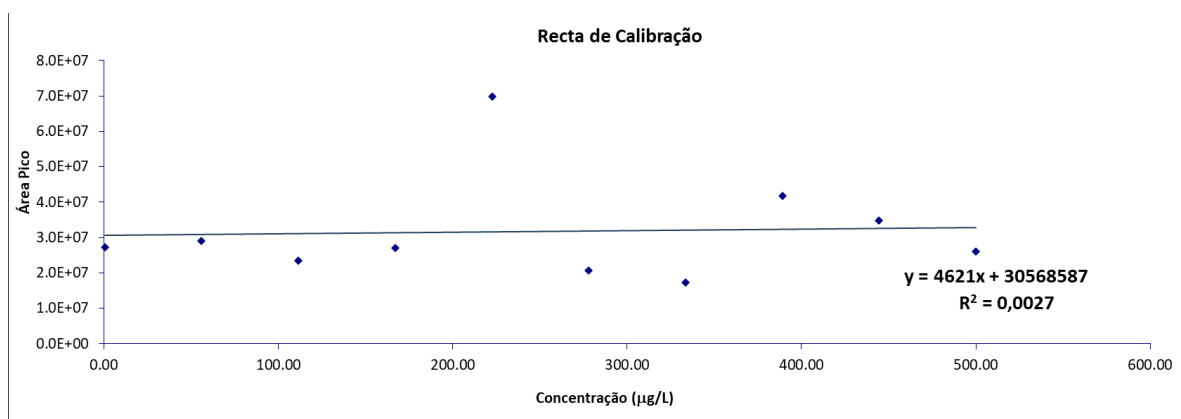


Figura H.12 – Reta de calibração da oxima de formaldeído para a gama 0,5µg/L a 5µg/L.

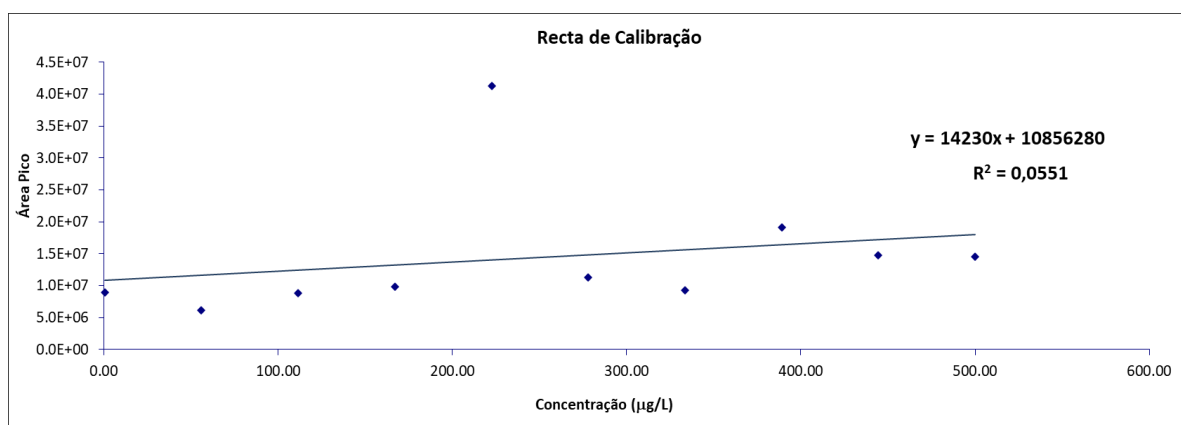


Figura H.13 - Reta de calibração da oxima de acetaldeído para a gama 0,5µg/L a 5µg/L.

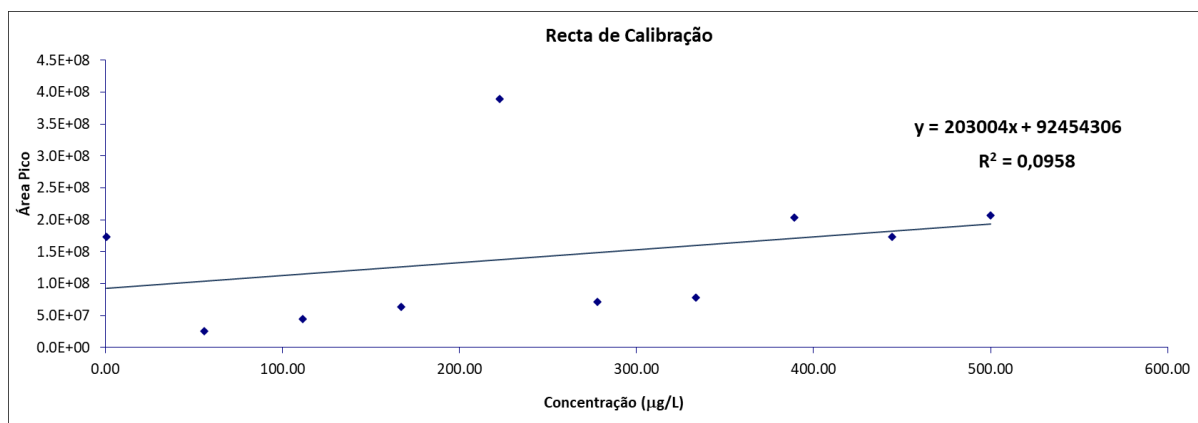


Figura H.14 - Reta de calibração da oxima de propanal para a gama 0,5µg/L a 5µg/L.

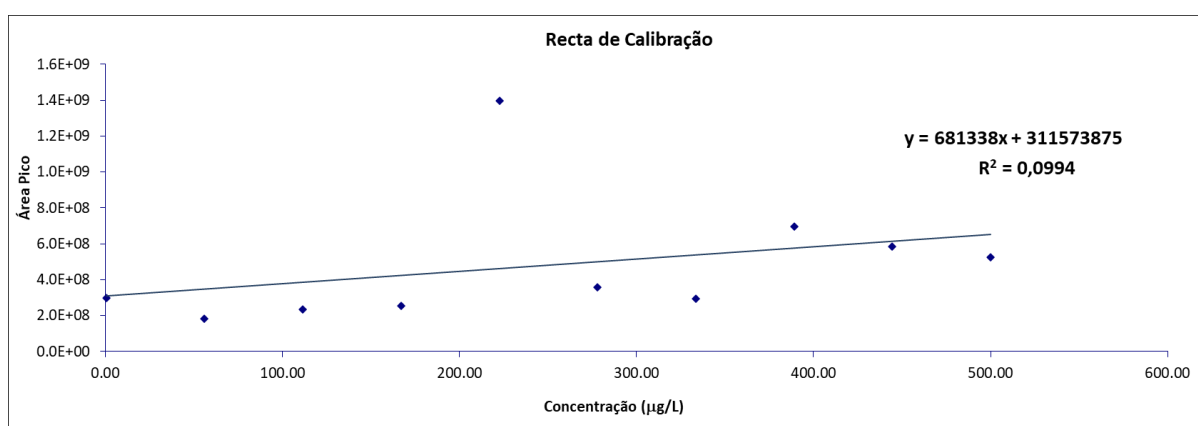


Figura H.15 - Reta de calibração da oxima de butanal para a gama 0,5µg/L a 5µg/L.

Como se pode verificar pelas figuras H.12 a H.15, não existe linearidade na gama de trabalho estudada. Verificou-se ainda que, ao analisar os padrões através de uma solução conjunta, existe competição dos analitos na reação de derivatização, podendo este ser um dos fatores que impossibilita a linearidade. Deste modo, as análises dos aldeídos pelo método a estudar teriam de passar a ser feitas com recurso a soluções individuais de cada composto. Por este motivo e por falta de tempo completar o estudo dos restantes aldeídos, passou-se a analisar apenas o formaldeído, com a sua otimização e validação no capítulo 6.

Anexo I – Avaliação económica

Com o objetivo de completar o trabalho realizado, considerou-se pertinente a realização de uma avaliação económica de modo a ter uma perspetiva dos custos associados ao desenvolvimento de um método de análise.

Assim, foi estimado, dentro do possível, o custo dos materiais utilizados, incluindo o padrão comercial e o reagente de derivatização, bem como equipamentos (exemplo, custo de coluna, entre outros) ao longo do trabalho. Este custo encontra-se detalhado na figura I.1.

Tabela I.1 - Custos dos materiais considerados para a avaliação económica do método.

Tipo de material	Marca	Quantidade utilizada	Preço (€)
Fibras:			
PMDS/DVB/CAR	<i>Sulpeco</i>	2 Cx	400,00
PDMS/DVB	<i>Sulpeco</i>	1 Cx	200,00
PA	<i>Sulpeco</i>	1 Cx	200,00
PDMS	<i>Sulpeco</i>	1 Cx	200,00
CAR/PDMS	<i>Sulpeco</i>	1 Cx	200,00
Consumíveis:			
Septos	<i>Gerstel</i>	10 embalagens	740,00
Acessórios:			
Coluna	<i>Agilent</i>	1 unidade	1128,20
Suporte de fibras	<i>Supelco</i>	1 unidade	208,50
Capsulador	<i>Agilent</i>	1 unidade	212,60
Decapsulador	<i>Agilent</i>	1 unidade	77,00
Seringas	<i>Agilent</i>	5 unidades	256,50
Padrão analítico:			
Formaldeído	<i>Alfa Aesar</i>	1 frasco	28,40
Reagente:			
PFBHA	<i>Alfa Aesar</i>	2 frascos	870,00
Total			4721,20